



**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA**

TESIS DOCTORAL:
**Esofagitis eosinofílica y linfocitos intraepiteliales
duodenales: alteración de la inmunidad de la mucosa
más allá del esófago**

Presentada por Dña. Gloria Domínguez Ortega
para optar al grado de
doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Dirigida por:
Dr. Manuel Ramírez Orellana

Junio 2017

TESIS: Esofagitis eosinofílica y linfocitos intraepiteliales duodenales: alteración de la inmunidad de la mucosa más allá del esófago.

DOCTORANDO: Dña. Gloria Domínguez Ortega

ABSTRACT/RESUMEN

La esofagitis eosinofílica (EEO) es un desorden inmunológico crónico de base alérgica. La tolerancia oral está alterada en las patologías alérgicas. Una gran parte de los mecanismos de regulación de la tolerancia oral asientan en la mucosa intestinal donde los linfocitos intraepiteliales (LIEs) juegan un papel decisivo. El aumento de los LIEs en la enteropatía alérgica se ha descrito mediante técnicas inmunohistoquímicas, aunque de forma diferente al patrón característico del LIE en la enfermedad celíaca (EC). Los linfocitos intraepiteliales intestinales podrían estar implicados en la patogenia de la EEO.

OBJETIVOS: Caracterizar el inmunofenotipo de los LIEs de una muestra de pacientes pediátricos con EEO mediante citometría de flujo. Describir las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con EC y con EEO. Comparar el linfograma LIE de los pacientes celíacos con el de los pacientes con EEO. Analizar si las variables epidemiológicas y clínicas modifican el linfograma intraepitelial de los pacientes con EEO. Estudiar si los tratamientos dietéticos y/o farmacológicos modifican el linfograma LIE en los enfermos con EC o EEO.

PACIENTES Y MÉTODOS: Estudio prospectivo y observacional. La población principal de estudio fueron pacientes con EEO confirmada. Se incluyó una muestra pequeña de pacientes con EC para validar la técnica de citometría de flujo y como control. Se han utilizado como valores de normalidad de dicha técnica los referidos en la bibliografía. Las historias clínicas de los pacientes

citados para una endoscopia digestiva alta en la Unidad de pruebas funcionales del Hospital Niño Jesús se revisaron y aquellos pacientes que cumplían los criterios de inclusión y no los de exclusión fueron seleccionados y sus datos clínicos y epidemiológicos registrados. Todos los pacientes recibieron la hoja de información sobre el estudio y consentimiento informado. Durante la realización de la prueba y dentro del proceso asistencial se tomaron 2 biopsias de intestino proximal (bulbo y duodeno) del total que se extrae para su estudio rutinario, y se enviaron en medio de cultivo de linfocitos al servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Las muestras se analizaron en las siguientes 12-24 h a su recepción realizando estudio del LIE por citometría de flujo. Se ha utilizado el sistema STATA para la realización de los análisis estadísticos.

RESULTADOS: Se incluyeron 45 pacientes de los que 37 (82,2%) tuvieron un diagnóstico principal de EoE y 8 (17,8%) de enfermedad celiaca (EC). El grupo de EEO se subdividió según el número de eosinófilos en mucosa esofágica: EEO activa (≥ 15 eos/CGA) y EEO no activa (< 15 eos/CGA). Se registraron 26/37 (70,3%) pacientes que cumplían el criterio histológico de EEO activa. Se encontró que la frecuencia de niños con EEO era 5,17 veces mayor que en niñas y la de niñas con EC era 7 veces mayor que en niños ($p < 0,001$). La edad media de los niños cuando se realizó la endoscopia digestiva fue de 10,1 años (entre 2,2 y 17,3 años). Por grupos de edad, 19 (51,4%) niños eran > 10 años, 15 (40,5%) tenían entre 5 y 10 años y 3 (8,1%) eran < 3 años. No se encontraron diferencias significativas de edad entre los pacientes con EEO y los EC ($p=0,938$). El 91,9% (34/37) de los pacientes con EEO presentaban antecedentes personales de enfermedad atópica, con diferencias significativas

respecto a los pacientes celíacos para el asma (44,4% vs 0,0% respectivamente, $p=0,04$) y para alergia a alimentos IgE mediada (67,5% vs 0,0% respectivamente, $p<0,001$). Se encontró que los pacientes EEO con antecedente personal de dermatitis atópica (DA) (55,6%) tenían con más frecuencia EEO activa ($p=0,034$). De los pacientes con EEO en los que se valoró la IgE total, el 79,4% (27/34) la tenían elevada y el mismo número tenía al menos una IgE específica positiva para algún alimento. El 67,5% (25/37) de los pacientes con EEO ya estaban diagnosticados de alergia alimentaria IgE mediada y el test cutáneo formaba parte del diagnóstico y/o seguimiento, además el 55,9% presentaban eosinofilia. Se encontró linfocitosis duodenal (Marsh 1: >25% de LIEs) en 5 (13,5%) vs 3 (37,5%) de los pacientes con EEO y EC respectivamente sin que la diferencia fuese significativa ($p=0,137$). En 30 (81,0%) pacientes con EEO se objetivaron signos sugerentes de EEO en la EDA (exudados algodonosos, surcos longitudinales marcados, traquealización, estenosis, friabilidad de mucosa). Se estudió también si en los pacientes con EEO la descripción de los signos de EEO en la EDA se asociaba a la actividad de la enfermedad según la anatomía patológica, pero no se encontraron diferencias significativas ($p=0,403$). El porcentaje de infección HP en EEO fue 24,2% y en EC 37,5%, sin encontrar diferencias significativas ($p=0,369$). En el momento de la EDA, 25 (67,6%) pacientes con EEO seguían algún tipo de dieta. De ellos 15 (40,5%) estaban en tratamiento dietético exclusivo. Ocho pacientes (21,6%) estaban en tratamiento sólo con IBPs (inhibidores de la bomba de protones). En 10 (24,3%) pacientes el tratamiento combinaba dieta y tratamiento médico, de ellos 9 tenían tratamiento dietético junto con IBP. Por último en frecuencia, 4 pacientes no recibían tratamiento, 3 por ser la primera

endoscopia diagnóstica de EEO, y por lo tanto con enfermedad activa y 1 en que la EDA se realizó de control tras normalización de las EDA años antes y reaparición de clínica digestiva. Sólo 1 paciente recibía tratamiento corticoideo (Fluticasona MDI) deglutido, combinado con dieta. Ninguno recibía tratamiento corticoideo sistémico.

Los EC presentaban un patrón LIE claramente diferenciado de los EEO, con incremento de LIEs, linfocitos T $\gamma\delta$ y disminución de Natural Killer intestinales (iNK), con significación estadística. Sin embargo, la diferencia en las alteraciones encontradas en el porcentaje de LIEs totales respecto de las células epiteliales intestinales alterado (CEI) en duodeno en ambos grupos no alcanzó significación estadística. Dado que la dieta sin gluten normaliza la expresión de los LIEs respecto del total de CEI en los celíacos, el análisis por separado de ambos grupos segregados entre dieta sin o con gluten debería diferenciar ambas poblaciones (EC vs EEO). Sin embargo, aún tomando gluten, tanto los pacientes celíacos como los EEO tienden a presentar los LIEs en duodeno alterados sin diferencias significativas ($p > 0,05$). El 70% (26/37) de los pacientes con EEO presentaba alteración en al menos un compartimento del LIE. El 19% (7/37) tenía alteración en dos de los compartimentos del LIE: en 4 se encontraban elevados en alguna porción de duodeno los LIEs respecto de CEI y disminuidas las iNK y en 3 estaban elevados los LT $\gamma\delta$ con disminución de las iNK. Nos planteamos si la actividad de la EEO a nivel local esofágico marcada por el nº de eosinófilos en esófago $\geq 15/\text{CGA}$, se asociaba a alteración en el LIE duodenal. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas. No encontramos asociación de los datos demográficos con las alteraciones del LIE en EEO salvo en el porcentaje de iNK respecto de los LIEs

en duodeno $\leq 20\%$. Se dividió a los pacientes en 2 grupos (≤ 10 años y > 10 años) y comparamos los LIEs entre ellos obteniendo significación estadística en: 2/18 (11,1%) vs 9/18 (50%) respectivamente ($p=0,027$). La frecuencia de alteraciones en el LIE duodenal de pacientes EEO con *Helicobacter pylori* es menor que en los pacientes EEO sin la infección, sin embargo estas diferencias no fueron significativas ($p>0,05$). No encontramos asociación entre las pruebas de laboratorio analizadas y las alteraciones del LIE en pacientes con EEO.

Se encontró que el porcentaje de LIE del total de CEI (≥ 12) en duodeno, se asociaba de forma estadísticamente significativa con un mayor número de eosinófilos en sangre periférica ($p<0,001$) y en mucosa esofágica ($p= 0,021$).

CONCLUSIONES: Los pacientes EEO estudiados en esta tesis constituyen un grupo fenotípico complejo, por las mayores tasas de atopia y de alergia IgE mediada a alimentos que las referidas en la literatura. En nuestra serie, los pacientes con DA presentan con mayor frecuencia EEO activa. El antecedente de DA podría actuar como un factor de mal pronóstico para el control de la enfermedad y podría determinar la elección de terapias más intensas desde el inicio del tratamiento. La linfocitosis duodenal en el estudio histológico podría suponer el primer hallazgo de la alteración de la mucosa gastrointestinal fuera de la mucosa esofágica en la EEO. El LIE duodenal estudiado por citometría de flujo se encuentra alterado en un alto porcentaje de pacientes con EEO. El número de eosinófilos en sangre periférica y en mucosa esofágica se asocian al porcentaje de linfocitos intraepiteliales respecto del total de células epiteliales en duodeno. Nuestros resultados apoyan que la esofagitis eosinofílica es una enfermedad inmunomediada donde el sistema inmune de la mucosa intestinal y la inmunidad sistémica están implicados en la patogenia de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Dar las gracias es liberador. Enriquece a quienes las reciben y también a quien las da.

Dar gracias por una tesis es tan importante como la tesis en sí, o quizá más. Es agradecer desde el principio, por todo el proceso, por el camino que te lleva a ella y el que sigue después. Nunca se llega solo.

Dar gracias primero a Dios, porque para el que cree, nada ocurre sin él.

Gracias a mis padres, Antonio y Benita, que me educaron en el esfuerzo, el respeto y el amor incondicional. Y a mis hermanos Ángel y Carlos, con los que crecí feliz, porque a su manera, cada uno me ha dado lecciones de superación.

Gracias a Álvaro, mi mano amiga, mi retina encendida, mi latido sereno. Gracias porque siempre creyó en mí. Porque el camino no ha sido fácil, pero él lo ha ido allanando, de una forma silenciosa, a veces imperceptible, pero constante, ofreciéndome siempre una copa llena de optimismo y vitalidad.

Gracias a mis hijos, Sergio y Emma, porque con ellos he aprendido que en Medicina hay más preguntas que respuestas, que investigar no es un privilegio de unos pocos sabios, sino una exigencia inherente al buen médico. Por enseñarme a luchar, sin perder la sonrisa, aún cuando no tenía respuestas. Esta tesis es el fruto de una década de incertidumbres, pero también de crecimiento personal, junto a ellos.

Gracias a mis amigos y resto de familiares, y sobre todo a Araceli, por estar ahí, por la escucha, por recordarme que más allá de mis propias fronteras sigue habiendo vida.

Gracias a Manuel, por su confianza en mi trabajo, por sus consejos, por darme la oportunidad de contar la historia que elegí para darle sentido a muchas otras. Por acompañarme, dejándome mi espacio, regalándome parte del suyo.

Gracias a Ana y a todas las compañeras del laboratorio, por recibirme con una sonrisa, por enseñarme su ciencia.

Gracias a Garbiñe, por su colaboración desinteresada, por sus consejos, por compartir sus conocimientos con maestría y sencillez.

Gracias a Lorena, por su paciencia, por sus sugerencias, por su disponibilidad. Sólo ella sabe cuantas vueltas lleva esta noria.

Gracias a Neil, a Rosan, a Nikhil, a Dipa y a todos los que durante un tiempo, empujaron bajo la lluvia mi espíritu investigador.

Gracias a Juan Carlos y a Mercedes, porque me enseñaron Medicina de la buena cuando nada era fácil, porque aunque cambié de cuento, la historia que escribo ahora es la misma historia. Porque han sido mi referente, porque lo siguen siendo.

Por último, gracias a los pacientes y a sus familias, por dejarse guiar en la enfermedad, porque con ellos siento que merece la pena el esfuerzo.

Esta tesis es de todos vosotros. Gracias.

Madrid, 10 de Junio de 2017



Conjuro

Que cada semilla contenga un bosque

Carmen Camacho

INDICE

Listado de abreviaturas.....	11
I.- INTRODUCCIÓN.....	17
1. Sistema inmune de la mucosa gastrointestinal.....	17
1.1. Tejido linfoide del aparato digestivo.....	18
1.1.1. El epitelio intestinal.....	18
2. Tolerancia oral en la mucosa intestinal.....	21
3. Esofagitis eosinofílica.....	24
3.1. Concepto.....	24
3.2. Epidemiología.....	24
3.3. Patogenia	25
3.3.1 EEO y alteraciones genéticas y moleculares.....	26
3.3.2.EEO y atopia.....	29
3.3.3.EEO y tolerancia oral.....	30
3.3.4 EEO e inhalantes.....	31
3.3.5. Relación entre la EEO y la ERGE.....	32
3.4. Diagnóstico.....	33
3.4.1. Manifestaciones clínicas.....	34
3.4.2. Diagnóstico endoscópico.....	35
3.4.3.Diagnóstico histológico.....	40
3.5. Tratamiento.....	40
3.5.1. Inhibidores de la bomba de protones (IBPs).....	40
3.5.2. Tratamiento dietético.....	41
3.5.3. Esteroides sistémicos.....	43
3.5.4. Esteroides tópicos.....	44
3.5.5. Terapias biológicas.....	48
4. Enfermedad celíaca.....	50
4.1. Inmunopatogenia de la EC.....	50
4.2. Diagnóstico y seguimiento de la EC.....	54
4.3. Linfograma intraepitelial por citometría de flujo en EC.....	58
5. Esofagitis eosinofílica y enfermedad celíaca.....	62
II.- HIPÓTESIS	65
III.- OBJETIVOS.....	65
1. Objetivo principal.....	65

2. Objetivos secundarios.....	65
IV.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1. Población de estudio.....	67
2. Reclutamiento de pacientes y obtención de muestras.....	69
3. Técnica de citometría de flujo para estudio del LIE.....	69
a. Desepitelización de biopsias duodenales.....	69
b. Marcajes de membrana.....	70
c. Procesamiento estandarizado de las muestras.....	71
d. Análisis en el citómetro.....	72
4. Variables epidemiológicas, clínicas y del LIE duodenal.....	75
V.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	77
VI.- RESULTADOS.....	79
1. Descripción epidemiológica de la población de estudio.....	79
2. Antecedentes familiares y personales de atopia.....	81
3. Clínica.....	82
4. Pruebas complementarias.....	85
4.1. Inmunoglobulina A.....	85
4.2. Pruebas serológicas de EC.....	85
4.3. Pruebas de alergia en pacientes con EEO.....	86
4.4. Número de eosinófilos en sangre periférica.....	90
4.5. Resultados de la endoscopia digestiva alta (EDA) e histológico.....	91
4.5.1. Clasificación Marsh.....	91
4.5.2. Signos de gastritis en la EDA.....	92
4.5.3. Signos sugerentes de EEO en la EDA.....	92
4.5.4. Gastritis en el estudio histológico.....	93
4.6. Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	94
5. Tratamiento.....	94
6. Linfograma intraepitelial duodenal (LIE).....	97
6.1. Análisis de factores potencialmente modificadores del LIE duodenal en EEO.....	105
6.1.1. LIE duodenal y datos demográficos.....	105
6.1.2. LIE duodenal y síntomas.....	106
6.1.3. LIE duodenal e infección por <i>Helicobacter pylori</i>	106

6.1.4.	LIE duodenal y pruebas de laboratorio.....	108
6.1.4.1.	LIE y IgE total.....	108
6.1.4.2.	LIE y pruebas de alergia IgE mediada.....	109
6.1.4.3.	LIE y eosinófilos en sangre periférica.....	110
6.1.5.	LIE duodenal y hallazgos endoscópicos.....	113
6.1.6.	LIE duodenal y hallazgos histológicos.....	114
6.1.6.1.	LIE y nº de eosinófilos en mucosa esofágica.....	114
6.1.6.2.	LIE y gastritis en el estudio histológico.....	116
6.1.6.3.	LIE y clasificación Marsh.....	117
6.1.7.	LIE duodenal y tratamiento recibido.....	118
6.1.7.1.	Sin tratamiento.....	118
6.1.7.2.	Tratamiento dietético exclusivo.....	119
6.1.7.3.	Tratamiento exclusivo con IBP.....	120
6.1.7.4.	Tratamiento con corticoides deglutidos.....	120
6.1.7.5.	Tratamiento combinado.....	121
VII.-	DISCUSIÓN.....	123
VIII.-	CONCLUSIONES.....	142
IX. -	BIBLIOGRAFÍA.....	145

Listado de abreviaturas

AADG: anticuerpos antipéptidos deaminados de gliadina

AcMo: anticuerpos monoclonales

AEm: anticuerpos antiendomiso

AF: antecedentes familiares

AP: antecedentes personales

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ASB: albúmina sérica bovina

ATG2: anticuerpos anti-transglutaminasa-2

BOV: budesonida oral viscosa

CARD15: dominio reclutador de caspasa 15. *Caspase recruitment domain 15*

CCL: ligando de quimiocina. *Chemokine (C-C) motif ligand*

CCR: receptor de quimiocina. *C-C chemokine receptor*

CD: célula dendrítica

CEI: célula epitelial intestinal

CGA: campo de gran aumento

CLI: célula linfoide innata

CPA: célula presentadora de antígeno

DA: dermatitis atópica

DN: doble negativa

DS: desviación standard

DSG: dieta sin gluten

DSG-1: desmogleína

DTT: ditioneitol

EAF: epitelio asociado al folículo

EC: enfermedad celíaca

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético. *Ethylenediaminetetraacetic*

EEM: error estándar de la media

EEo: Esofagitis eosinofílica

EEo-RIBP: esofagitis eosinofílica respondedora a IBP

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico. *Epidermal growth factor receptor*

ELISA: enzimoimmunoanálisis. *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERGE: enfermedad por reflujo gastroesofágico

FITC: fluoresceína

FLM: folículo linfático mesentérico

FoxP3: factor de transcripción *forhead box P3*

FP: propionato de fluticasona

GADPH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

α GalCer: α -Galactosilceramida

GALT: tejido linfático asociado al aparato digestivo (*gut associated lymphoid tissue*)

GM-CSF: factor estimulador de colonias de monocitos y macrófagos.

Granulocyte macrophage colony-stimulation factor

HBSS: solución salina balanceada de Hank. *Hank's balanced salt solution*

HLA-DQ: receptor de antígeno leucocitario humano DQ. *Human leukocyte antigen receptor*

IBPs: inhibidores de la bomba de protones

ICAM: molécula de adhesión intercelular. *Intracellular adhesion molecule*

IFN γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

LIE: linfograma intraepitelial

LIEs: linfocitos intraepiteliales

LP: lámina propia

LPS: lipopolisacárido

LTD4: leucotrieno D4

LTE: leucotrieno E

LTgd ($\gamma\delta$): linfocito T gamma delta

LTi: célula inductora de tejido linfoide. *Lymphoid tissue-inducer cell*

MC: medio de cultivo completo (suplementado)

MDI: inhalador en cartucho presurizado. *Metered dose inhaler*

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad. Major histocompatibility complex

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK: célula citolítica natural. *Natural killer cell*

iNK: célula natural killer invariante/intestinal

NKT: célula T natural killer

iNKT: célula T natural killer invariante

NOD2: dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2. *Nucleotide oligomerization domain 2*

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

PBS: tampón salino fosfato. *Phosphate buffered saline*

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. *Quantitative polymerase chain reaction*

PE: ficoeritrina

PE-Cy7: ficoeritrina-cianina-7

PHA: fitohemaglutinina. *Phytohaemagglutinin*

PMA: acetato de forbol miristato. *Phorbol myristate acetate*

PP: placa de Peyer (*Peyer's patch*)

ROC: receiver operating characteristic curve analysis

RPMI: medio para cultivos celulares (*Roswell Park Memorial Institute medium*)

RRP: receptor de reconocimiento de patrones

SFED: dieta de eliminación de seis alimentos. *Six food elimination diet*

SNP: polimorfismo de un único nucleótido (*single nucleotide polymorphism*)

TA: temperatura ambiente

LTc: linfocito T citotóxico

TCR: receptor de células T. *T cell receptor*

TG2: transglutaminasa tisular

TGFβ: factor transformante de crecimiento beta. *Transforming growth factor beta*

Th: linfocito T cooperador. *T helper cell*

TLR: receptor toll-like. *Toll-like receptor*

TNF: factor de necrosis tumoral. *Tumor necrosis factor*

Treg: célula T reguladora

TSLP: linfopoyetina estromal tímica (*Thymic stromal lymphopoietin*)

I. INTRODUCCIÓN

1. Sistema inmune de la mucosa gastrointestinal

El tracto gastrointestinal es el órgano inmunológico más grande del cuerpo, sometido a una estimulación constante tanto por antígenos de la dieta y de la microbiota, como por gérmenes patógenos ⁽¹⁾. Las superficies mucosas del organismo son la principal barrera contra dicha carga antigénica ⁽²⁾. A pesar de esta continua estimulación, el tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal ha desarrollado la sorprendente habilidad de distinguir entre agentes nocivos (ej. gérmenes patógenos), a los que neutraliza mediante eficientes mecanismos protectores, y antígenos inocuos, contra los que no genera respuestas (ej. bacterias comensales, antígenos de la dieta) ⁽³⁾.

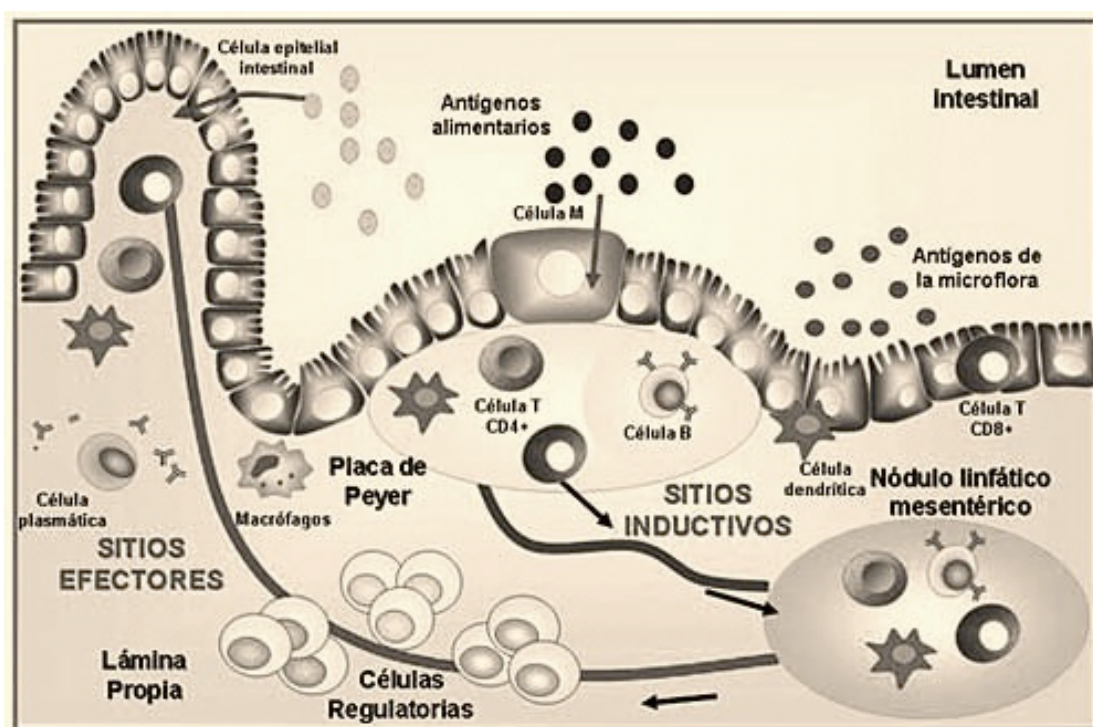


Figura 1. Sistema inmune de la mucosa intestinal. Porto rato C et al. La modulación del sistema inmune de mucosas con polisacáridos. Bases para una atractiva alternativa en terapia. Acta bioquím. clín. latinoam. v.41 n.2 La Plata abr./jun. 2007.

Estas respuestas dependen de la inmunidad innata y de la adaptativa, con especial relevancia de los mecanismos de tolerancia oral. Las principales poblaciones del sistema inmunitario encargadas de mantener la homeostasis son los linfocitos intraepiteliales (LIE) y las poblaciones de la lámina propia (LP).

1.1. Tejido linfoide del aparato digestivo.

El tejido linfoide del aparato digestivo (GALT: gut associated lymphoid tissue) se puede dividir en tejido linfoide de inducción y tejido linfoide efector ^(1, 2). En el intestino, el tejido de inducción lo componen estructuras de tejido linfoide que residen en la pared, como las Placas de Peyer (PP) del intestino delgado, y los folículos linfoides mesentéricos (FLM), estructuralmente parecidos a las PP, y que se encuentran tanto en el intestino grueso como en el intestino delgado. La función del tejido de inducción es la captación, el procesamiento y la presentación de antígenos. El tejido efector está formado por la LP mucosa y el epitelio intestinal, donde asientan las células T y B maduras que migran desde las PP y los FLM ⁽²⁾.

1.1.1. El epitelio intestinal.

El epitelio intestinal se compone de una capa de células especializadas con un reborde en cepillo en la superficie de contacto con la luz intestinal. Conforman una barrera entre el organismo y el contenido del intestino. Además las CEI o enterocitos son responsables de la absorción de los nutrientes. No sólo realizan una función pasiva como barrera biológica sino que participan activamente en la respuesta inmunitaria, con capacidad para verter IgA al interior del tubo digestivo, producir péptidos antimicrobianos y citocinas proinflamatorias en respuesta a los antígenos bacterianos ⁽⁴⁾. Recientemente, se ha sugerido que la

célula epitelial además puede actuar como célula presentadora tras captar antígeno en los microvilli de la superficie apical y presentarlo a los linfocitos T CD4⁺ en la superficie basal ⁽⁵⁾. El epitelio incluye también otras células especializadas como son las células caliciformes, que secretan la capa de mucus protectora que recubre al epitelio, y las células de Paneth, que secretan grandes cantidades de péptidos antimicrobianos y se encuentran en las criptas del intestino delgado ⁽²⁾.

Los LIEs son unas subpoblaciones heterogéneas de linfocitos que se encuentran entre las CEI. La mayoría de los LIE contiene abundantes gránulos citoplasmáticos con actividad citotóxica con capacidad para secretar citocinas efectoras (IFN γ , IL-2, IL-4 o IL-17) ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾. Además, estas poblaciones pueden expresar receptores propios de las células NK ⁽⁷⁾. La principal función de las NK es la protección y defensa de la mucosa intestinal. Los LIE expresan en su superficie CCR9, cuyo ligando CCL25 (ligando de quimiocinas-25, *chemokine C-C motif ligand-25*) es ⁽⁸⁾ producido por las CEI. La interacción entre receptor y ligando juega un papel decisivo en la migración de los LIE al intestino.

Los LIEs se clasifican en dos grandes grupos: LIEs naturales y LIEs inducidos ^(1, 9). Los LIEs naturales se subdividen a su vez en linfocitos T TCR $\gamma\delta$ y linfocitos T TCR $\alpha\beta$, la mayoría CD8⁺. Las funciones principales de los LIE $\gamma\delta$ son la reparación y el mantenimiento de la barrera epitelial, la defensa frente a patógenos intestinales y la contribución a los mecanismos de tolerancia oral. Los LIE TCR $\alpha\beta$ intervienen en la protección de la barrera mucosa en el momento de la colonización bacteriana hasta que se desencadena una respuesta inmunitaria específica frente al patógeno que la ha generado ^(7, 10-12). Los LIEs naturales se generan en el timo por un proceso de maduración

alternativo en el que se seleccionan linfocitos T doblemente negativos (CD4⁻CD8⁻) con un marcador CD3 atípico, que se dirigen posteriormente al intestino donde sufren un proceso de maduración final ⁽⁹⁾. Los LIEs inducidos proceden de la selección positiva de células precursoras de linfocitos T TCRαβ CD8⁺ o CD4⁺ que se produce normalmente en el timo. Cuando alcanzan el flujo sanguíneo, estas células precursoras se convierten en linfocitos T no activados (naives) que pueden diferenciarse a células T TCRαβ CD4⁺ o CD8⁺ maduras en respuesta a ciertos antígenos. Migran entonces al intestino para formar parte de los LIEs inducidos presentes en el epitelio intestinal. Se encargan de mantener la barrera epitelial, impedir la translocación de bacterias patógenas y controlar la respuesta inmunitaria frente a antígenos no patogénicos ^(9, 13).

La proporción de LIEs en la mucosa intestinal disminuye caudalmente a lo largo del intestino. Su densidad es máxima en el intestino delgado proximal, con un porcentaje aproximado del 25% en adultos sanos ⁽¹⁴⁾, para descender hacia la zona distal del intestino grueso hasta el 5% de LIEs en el recto ⁽¹⁵⁾. La mayoría de los LIEs (>70 %) son células T CD3⁺ y en menor proporción (10-20%) son células CD3⁻. De los LIE CD3⁺, un 80% expresa un TCRαβ, siendo en la gran mayoría linfocitos T CD8⁺ (>85 %) , mientras que sólo un 10% de los LIE TCRαβ expresarían el marcador CD4. El resto de LIE CD3⁺ expresa el TCRγδ. Los linfocitos Tγδ presentan una expresión variable de CD8 (40-80%) ⁽¹⁶⁾. Los LIE con fenotipo CD3⁻ parecen pertenecer a un linaje natural killer (NK, células citolíticas naturales) ^(17, 18) por lo que se denominan células NK-like. Dentro de este grupo encontramos células T precursoras, y células NK y, ocasionalmente, linfocitos aberrantes que se caracterizan por la internalización de la molécula CD3 al citoplasma y su ausencia en la membrana celular ^(15, 17). Los LIE CD3⁻

en el feto son fundamentalmente células precursoras de linfocitos T, aunque también se encuentran células NK en esta etapa. En los niños, la población NK-like es una mezcla de células precursoras y células NK, siendo esta última población cada vez más predominante según avanza la edad. En los ancianos y en situaciones patológicas como la EC refractaria y el linfoma asociado a la mucosa intestinal, se produce un aumento de linfocitos T aberrantes que internalizan el receptor CD3 ⁽¹⁷⁾. Por último, dentro de los LIE encontramos también una población con características duales que son las células T natural killer invariantes o iNKT, que se consideran células linfoides innatas (CLI) y que tienen especial importancia dentro de la tolerancia oral ^(19, 20).

2. Tolerancia oral en la mucosa intestinal

La tolerancia oral se refiere a un estado de inhibición activa de las respuestas inmunitarias a un antígeno mediante exposición previa a través de la vía oral ⁽²¹⁾. Normalmente, los antígenos dietéticos que escapan a la digestión y procesamiento luminal gastrointestinal entran en contacto con el epitelio intestinal y el sistema inmune de la mucosa subyacente de varias maneras. Los antígenos alimentarios pueden ser capturados por células dendríticas intestinales que extienden sus prolongaciones hacia el lumen ⁽²²⁾. Las partículas antigénicas pueden ser endocitadas por las células M que recubren las placas de Peyer y que las presentan a las células dendríticas en la región de la cúpula subepitelial y luego a los LB de los folículos subyacentes de las placas de Peyer ^(23, 24). El cambio de clase de la Inmunoglobulina A (Ig A) ocurre en los LB, mediado por el TGF- β que es secretado por los LT, contribuyendo así a la tolerancia oral ⁽²⁵⁾. Los antígenos dietéticos solubles pueden atravesar el epitelio intestinal a través de rutas transcelulares o paracelulares hasta

alcanzar a los linfocitos T o los macrófagos en la lámina propia ⁽²⁶⁾. Además de las células dendríticas, se piensa que las células epiteliales intestinales actúan como células presentadoras de antígenos no profesionales, dado que constitutivamente expresan moléculas de clase II del complejo de histocompatibilidad mayor en sus membranas basolaterales ⁽²⁷⁾ y presentan antígenos a células T previamente estimuladas.

Después de que el antígeno dietético entra en contacto con las células inmunes, la tolerancia oral puede ser inducida por dos mecanismos, dependiendo de la cantidad de antígeno (Fig. 2). La tolerancia oral a dosis altas está mediada por la anergia de los linfocitos T ⁽²⁸⁾, que ocurre a través de la unión del receptor de LT (TCR) en ausencia de señales co-estimulatorias ⁽²⁹⁾ o por eliminación de los linfocitos, lo que ocurre por medio de apoptosis mediada por el Fas ligando (véase Figura 2.B) La tolerancia a pequeñas dosis está mediada por las células T reguladoras. Además de los LT CD8+ ⁽³⁰⁾ y las células NKT ⁽³¹⁾, diversos tipos de LT CD4+ reguladores desempeñan un papel en la tolerancia a dosis bajas ⁽³²⁾. Estas células incluyen células TH3, que median la supresión a través del TGF- β segregado ⁽³³⁾, las células T reguladoras 1 (Treg1) que median la supresión a través de la secreción de interleucina (IL)-10 ⁽³⁴⁾, y los LT CD4+CD25+ que median la supresión posiblemente a través del TGF- β de superficie (véase la Fig. 1C) ⁽³⁵⁾. Una alteración en cualquiera de estos mecanismos se ha demostrado que resulta en la pérdida de la tolerancia oral a un antígeno en modelos animales y se supone que puede conducir a alergias alimentarias en los seres humanos.

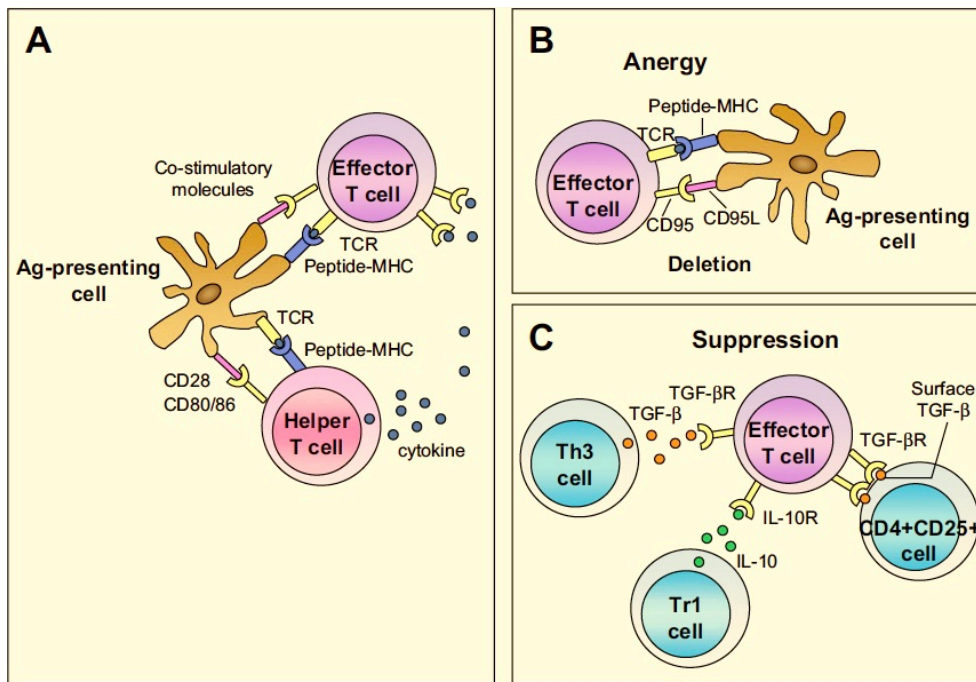


Figura 2. Mecanismos de tolerancia oral. A) Generación de la respuesta inmune. B) Tolerancia a altas dosis. C) Tolerancia a dosis bajas. Ag: antígeno; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor de célula T; Tr1: célula reguladora T. (Modificado de Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. J Allergy Clin Immunol 2005; 115(1):3-12.

Cada vez existe mayor evidencia de que algunas de las enfermedades autoinmunes, sistémicas u órgano-específicas en humanos puedan desencadenarse como consecuencia de una alteración en los mecanismos que promueven la tolerancia oral. Esto está ampliamente estudiado en la EC pero también en otras enfermedades donde se afectan otros órganos distintos del intestino delgado. Rostoker G et al demostraron un aumento significativo de los LIEs intestinales en pacientes con glomerulonefropatías primarias, sugiriendo que la pérdida de la tolerancia oral podría tener un importante rol en la patogenia de la enfermedad ⁽³⁶⁾.

3. Esofagitis eosinofílica

3.1. Concepto

La EEO es una enfermedad inflamatoria crónica del esófago con una patogénesis inmuno-alérgica, desencadenada primordialmente por alérgenos alimentarios pero también por inhalantes, caracterizada clínicamente por síntomas de disfunción esofágica e histológicamente por infiltración esofágica por eosinófilos cuyo límite patológico ha sido fijado arbitrariamente en ≥ 15 eosinófilos/campo de gran aumento [CGA], junto con otros cambios histológicos que acompañan dicha infiltración ⁽³⁷⁾. La EEO es una de las enfermedades, como la EC o la EI, en las que la tolerancia oral se encuentra alterada.

3.2. Epidemiología

En Estados Unidos y Europa, los estudios epidemiológicos han encontrado una prevalencia de EEO de 27,5 a 50 pacientes por 100.000 habitantes ⁽³⁸⁾. Una revisión sistemática sobre población pediátrica ha estimado la incidencia de EEO en niños en 0,7-10 / 100000 por persona/año, mientras que la prevalencia oscilaba entre 0,2-43/100000 ⁽³⁹⁾. Las diferencias en los datos de incidencia y prevalencia de la EEO en los distintos estudios dependen de los métodos aplicados para su cálculo y deben interpretarse con cautela ⁽⁴⁰⁾.

La EEO puede afectar a cualquier edad, desde la infancia hasta la vejez, pero el diagnóstico es más frecuente en niños, adolescentes y en adultos en la tercera y cuarta décadas de la vida ^(41, 42). Los varones se encuentran afectados con mayor frecuencia que las mujeres con una tasa variable según diversos estudios aunque una revisión sistemática reciente informa de una OR=2,01 ^(38, 41, 43). La razón de esta diferencia de género aún no se ha explicado, pero se ha

identificado una asociación con un polimorfismo de un único nucleótido (SNP: *single nucleotide polymorphism*) en el gen para la linfopoyetina estromal tímica (TSLP: *thymic stromal lymphopoietin*) en el cromosoma Xp22.3 y también en el cromosoma Yp11.3. Estos hallazgos podrían explicar la mayor prevalencia de EEO en los hombres ⁽⁴⁴⁾. Inicialmente se describió que la etnia caucásica estaba más afectada que otras, sin embargo la enfermedad puede afectar por igual a los afroamericanos, y en menor medida a asiáticos, nativos americanos e hispanos ⁽⁴⁵⁾.

3.3. Patogenia

La patogénesis de la EEO es compleja con muchos factores implicados, genéticos y medioambientales y otros mecanismos todavía desconocidos. Los factores ambientales parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo de la EEO. Aunque la tasa de herencia genética supone una carga de alrededor del 70%, el análisis de cohortes de gemelos ha revelado una importante influencia de los factores medioambientales (81.0%) comparado con el impacto adicional de la herencia genética (14.5%)⁽⁴⁶⁾. En este importante estudio epidemiológico realizado en Cincinnati (US), evaluaron a 6108 individuos de 1366 familias de pacientes con EEO encontrando que los familiares presentaban un riesgo de 10 a 64 veces mayor de padecer la enfermedad que la población general, con una incidencia de EEO en parientes de 1,8 al 2,4%, dependiendo del parentesco y el sexo ⁽⁴⁶⁾. También se ha descrito una asociación entre EEO y algunas alteraciones hereditarias del colágeno, como los Síndromes de Marfan y Ehlers-Danlos ⁽⁴⁷⁾.

3.3.1. EEO y alteraciones genéticas y moleculares

Se han identificado varias alteraciones genéticas en pacientes con EEO. El gen más comúnmente involucrado es el de la eotaxina-3, una quimioquina que activa a los eosinófilos y desempeña un papel fundamental en EEO. De hecho, se expresa en la mucosa esofágica 53 veces más que en los sujetos sanos ^(45, 48). Otra importante mutación se refiere al gen de la TSLP, y sus alelos de riesgo, tales como rs3806932, presentes en el cromosoma 5q22. La TSLP es una citoquina producida por las células epiteliales, cuya acción consiste en inducir una respuesta Th2 mediada por células dendríticas ^(49, 50). Un estudio reciente sugiere un posible mecanismo del papel de la TSLP para el desarrollo de EEO. Conforme a estos resultados, determinados antígenos alimentarios específicos (como la ovalbúmina del huevo de gallina) pueden desencadenar la secreción de TSLP por células epiteliales diferenciadas en el esófago que inducirían la respuesta Th-2 ⁽⁵¹⁾. Por tanto, la eotaxin-3 y la TSLP parecen estar implicadas en la disregulación de las células epiteliales. En la EEO también se altera la función de barrera. En este caso están involucradas otras dos proteínas: la filagrina y la desmogleina-1(DSG-1). Se ha encontrado un SNP del gen de la filagrina (2282del4) en una cohorte de 365 pacientes con EEO en comparación con 165 sujetos sanos, mostrando una asociación significativa con la enfermedad (OR=5,0) ⁽⁴⁹⁾. La hiperplasia de células epiteliales esofágicas observadas en pacientes con EEO es secundaria a la disminución de la expresión de los genes que regulan la diferenciación epidérmica. La disminución de la expresión de DSG1 promueve la regulación positiva de la periostina, una proteína de la matriz extracelular que participa en la fibrosis del tejido conectivo del esófago ⁽⁵²⁾.

El papel de los eosinófilos en la patogenia de la EEO es incuestionable, debido a la producción de potentes mediadores proinflamatorios, como son las citoquinas, GM-CSF, TGF- β y TNF- α y a su interacción con los linfocitos Th2 y sus citoquinas (IL-5, IL-4, IL-13) que son los actores principales en la coordinación de la inmunidad. La IL-5 es el mediador más importante para la activación eosinofílica y su reclutamiento. Su acción se confirma mediante estudios que demuestran su sobreexpresión en biopsias esofágicas de pacientes pediátricos con EEO ⁽⁵³⁾. La IL-13 se produce principalmente por células Th2 y su activación conduce a una generación aumentada de eotaxina-3. La concentración de IL-13 en las biopsias de esófago de pacientes con EEO está elevada ^(50, 54). La IL-4 estimula, junto con la IL-13, la producción de eotaxina-3 ⁽⁵⁰⁾. El gen calpain 14 (CAPN14) es un gen inducido por la IL-13 que codifica para la calpaína 14, una cisteína-proteasa, cuya expresión está aumentada en las biopsias esofágicas de pacientes con EEO. El papel de la calpaína 14 no está claramente definido, pero su expresión elevada resulta también en la pérdida de desmogleína y en otros mecanismos que alteran la barrera epitelial ^(50, 55). La IL-13 es responsable de aumentar la expresión de otros genes implicados en la patogénesis de EEO, como el BANCR (*BRAF-activated non-coding RNA*: ARN no codificante activado por BRAF) y el NTRK1 (*Neurotropic Tyrosine Kinase Receptor tipo 1*). Se ha demostrado por secuenciación de ARN en biopsias esofágicas que en la EEO existe una sobreexpresión del RNA BANCR, que es responsable de la hipereosinofilia local. El BANCR también está relacionado con el aumento de la producción de periostina ⁽⁵⁶⁾ y por tanto con la evolución a fibrosis del proceso inflamatorio. El NTRK1 es una diana temprana de transcripción de la IL-13 y su expresión está

más elevada en el tejido esofágico de pacientes con EEO que en sujetos sanos. Su mayor concentración determina una respuesta aumentada a su ligando NGF (*Neurotropic Tyrosine Kinase*) que tiene un papel primario en la hiperplasia de la mucosa esofágica ⁽⁵⁷⁾. La IL-13 es también responsable de la inducción de la producción de quimiocinas CCL11, CCL24 y CCL26, receptores de eotaxinas ⁽⁴⁵⁾. Se han identificado variantes genéticas en las regiones codificantes para las IL-5 y IL-13, pero su papel no está claramente definido ⁽⁵⁰⁾. Otro mediador liberado por eosinófilos e implicado en la patogenia de la EEO es el TGF- β 1, induce la proliferación celular epitelial y remodelación extracelular, a través de la expresión aumentada de genes implicados en fibrosis, como la metaloproteinasa de matriz 2 ⁽⁵⁰⁾. También el leucotrieno C4 puede contribuir a la fibrosis a través de sus metabolitos LTD4 y LTE, que son capaces de estimular la contracción de las células musculares lisas ⁽⁴⁵⁾.

Además de los eosinófilos y los LT, los mastocitos y las iNKT (natural killer invariantes) parecen desempeñar un papel activo en la patogénesis de la EEO ^(58, 59). La acción de los mastocitos está en parte mediada por la liberación de prostaglandina D2, que es capaz de reclutar eosinófilos en el esófago ⁽⁶⁰⁾. Además, en modelos animales de EEO, los mastocitos aumentan en número después de la estimulación alérgica, proporcionalmente con el tiempo de exposición y la dosis del estímulo ⁽⁶¹⁾. Las iNKT son una subpoblación de células T, cuya concentración en biopsias esofágicas de pacientes con EEO en comparación con sujetos sanos está también aumentada. Estas células son capaces de reconocer glicolípidos de los antígenos y esto puede explicar su papel en el desarrollo de EEO. Su activación induce la liberación de citoquinas inflamatorias, incluyendo IL-4, IL-5 e IL-13 ⁽⁶²⁾. Además, una reciente estudio

sugiere que los esfingolípidos de la leche pueden estimular las iNKT para producir estas citocinas ⁽⁵⁹⁾.

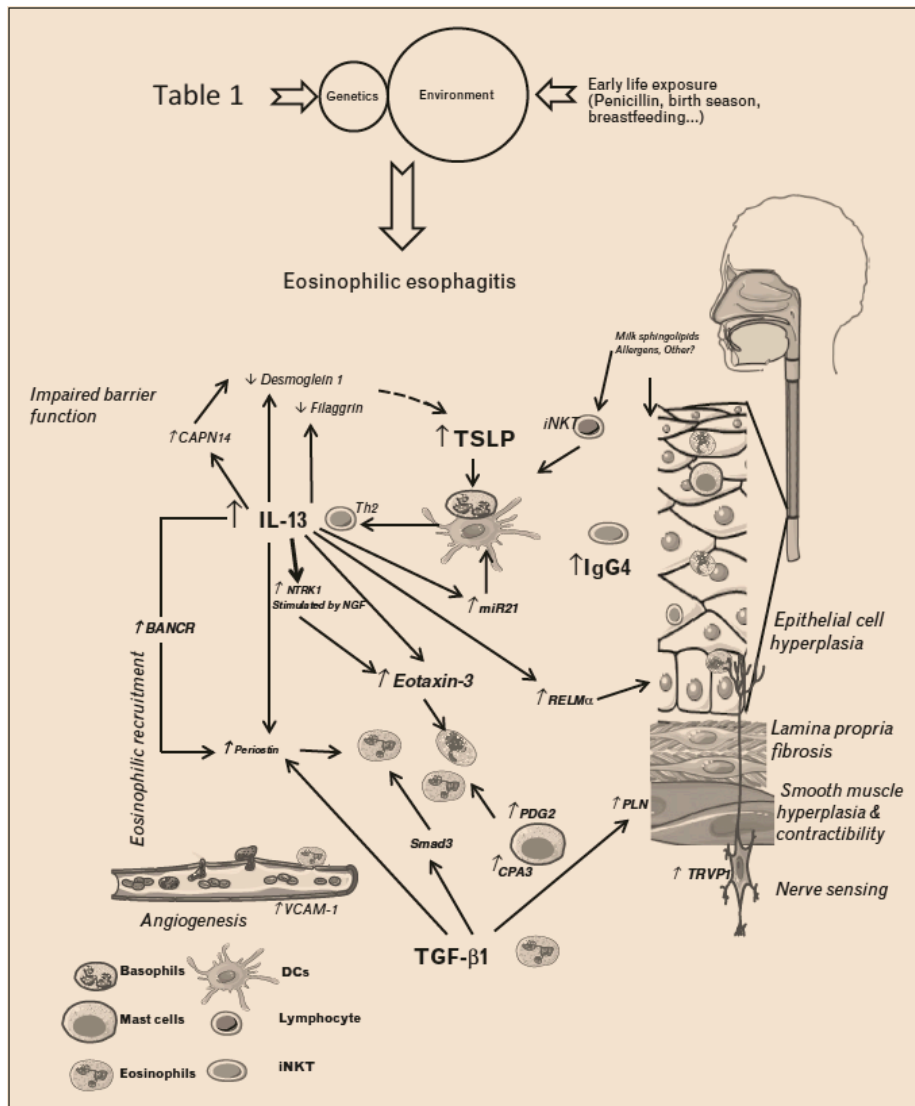


Figura 3. Patogenia de la esofagitis eosinofílica (EEO). Recientemente se ha demostrado un papel mayor del ambiente frente a la herencia genética. La patogénesis de la EEO se desarrolla en la encrucijada entre los desencadenantes externos y la predisposición genética en sujetos expuestos y predispuestos. La disregulación genética de la célula epitelial (TSLP, eotaxina-3), la inflamación inducida por la IL-13, el descenso de la función barrera (filagrina, desmogleína 1), y el aumento del infiltrado inmune inflamatorio (eosinófilos, linfocitos, mastocitos e iNKT) juegan un papel fundamental en la patogenia a nivel molecular.

Molecular pathogenesis of eosinophilic esophagitis. Blanchard C, 2015

3.3.2. EEO y atopía

El papel patogénico de la atopía ha sido analizado en estudios epidemiológicos.

La EEO está asociada con atopía en aproximadamente el 80% de los pacientes

(63, 64). En adultos se describe sensibilización a alérgenos inhalantes en el 86-

93% para inhalantes y en el 50-82% hacia alimentos ⁽⁶⁵⁾. En los pacientes pediátricos, una historia familiar de atopia se describe en el 73,5% ⁽⁶⁶⁾.

3.3.3. EEO y tolerancia oral

El desarrollo de EEO se ha descrito como una complicación de la inducción a tolerancia oral para alérgenos alimentarios. Ridolo et al. publicó el caso de un niño de 10 años que desarrolló EEO después de adquirir la tolerancia para el huevo con un protocolo de inducción oral. El paciente presentó dispepsia y disfagia 5 meses después de la reintroducción del huevo en la dieta, con demostración histológica de EEO. Los síntomas desaparecieron después de la eliminación del huevo de la dieta ⁽⁶⁷⁾. Posteriormente se han descrito y revisado otras publicaciones que confirman esta relación entre la inducción a tolerancia oral y la EEO, no sólo con el huevo, sino también con la leche y los cacahuetes ^(68, 69). En este contexto, es llamativo que sólo una pequeña parte de los pacientes con EEO y sensibilización alimentaria mediada por IgE presente anafilaxia. Los mecanismos subyacentes a esta respuesta no están bien definidos, pero parecen depender de una respuesta no mediada por IgE. Un estudio reciente ha puesto de relieve el papel de la IgG4 en el desarrollo de EEO, detectando un aumento en la producción de IgG4 en la lámina propia del esófago en biopsias de pacientes con EEO. Los autores sugieren que la EEO podría ser una patología asociada a IgG4, aunque se necesitarían más estudios para confirmar estos hallazgos ⁽⁷⁰⁾. En cualquier caso, la patogenia de la enfermedad parece desencadenarse a partir de una ruptura en los mecanismos de tolerancia oral. Los alimentos más comúnmente implicados en el desarrollo de la EEO son la leche de vaca, el huevo, el trigo, la soja y otras legumbres ⁽⁷¹⁾. Con menor frecuencia el pescado, los mariscos y los frutos

secos también son capaces de inducir mecanismos de respuesta alérgica que provocan EEO. En teoría cualquier alimento puede desencadenar la enfermedad, habiéndose detectado casos secundarios al consumo de pollo, ternera, patata, maíz y otros vegetales.

3.3.4. EEO e inhalantes

Existe evidencia sobre la participación de los alérgenos inhalantes en el desarrollo de la EEO. En un estudio de Yamazaki et al. realizado a 25 pacientes con EEO, se incubaron células mononucleares con alérgenos inhalantes (ácaros del polvo, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, y polen de ambrosía). Se detectaron niveles significativamente más altos de IL-5 e IL-13 en respuesta a los alérgenos, en comparación con los controles sanos⁽⁷²⁾. Otro estudio en modelos animales ha demostrado que la exposición intranasal al alérgeno inhalante (*A. fumigatus*) induce esofagitis eosinofílica, con degranulación eosinofílica e hiperplasia epitelial en los ratones expuestos⁽⁷³⁾. El rol que los aeroalérgenos juegan en la EEO es difícil de evidenciar. Una revisión sistemática de lo publicado hasta el 2015 no consiguió establecer patrones específicos. Se han comunicado diferencias estacionales, geográficas, y climatológicas en la prevalencia de la EEO, pero los mediadores exactos no han podido determinarse, aunque posiblemente se deban a los aeroalérgenos⁽⁷⁴⁾. Sí se sabe sin embargo, que muchos de los pacientes con EEO presentan una alta prevalencia de sensibilizaciones a pan-alérgenos, responsables de una reactividad cruzada entre los alérgenos inhalantes y alimentarios⁽⁷⁵⁾. También se ha sugerido una posible asociación entre la inmunoterapia sublingual utilizada como tratamiento para la alergia a inhalantes como desencadenante de EEO⁽⁷⁶⁾.

Existen diferencias en los patrones de sensibilización entre los niños y la población adulta afectados por EEO, con un aumento progresivo de la alergia a inhalantes y de forma paralela una disminución de la sensibilización alimentaria, lo que sugiere un papel predominante de los alérgenos alimentarios en la infancia.

3.3.5. Relación entre la EEO y la ERGE

Los eosinófilos en la mucosa esofágica pueden estar presentes en otras condiciones además de la EEO, especialmente en la ERGE.

En niños con alergias alimentarias y EEO se observa disfunción esofágica, dismotilidad, relajación del esfínter esofágico inferior y alteraciones en el tránsito esofágico, lo cual puede conllevar a ERGE.

La mejoría observada en pacientes con eosinofilia esofágica tratados con IBP se debe no solamente a la respuesta terapéutica sobre el reflujo ácido sino también al efecto antiinflamatorio de los IBP ^(77, 78). Hasta ahora se consideraba el diagnóstico de EEO respondedora a IBP (EEO-RIBP) en pacientes con síntomas esofágicos y hallazgos de infiltrado eosinofílico con respuesta histológica demostrada al tratamiento con IBP. Recientemente Molina-Infante J et al han revisado la clasificación de la respuesta a IBP en la eosinofilia esofágica y proponen abandonar el uso de la designación EEO-RIBP dado que los pacientes incluidos en esa entidad presentan características fenotípicas, moleculares, patogénicas y terapéuticas indistinguibles de aquellos con EEO que no responden a IBP, por lo que deberían ser incluidos dentro del espectro de EEO y no como una entidad aparte (Figura 3) ⁽⁷⁹⁾.

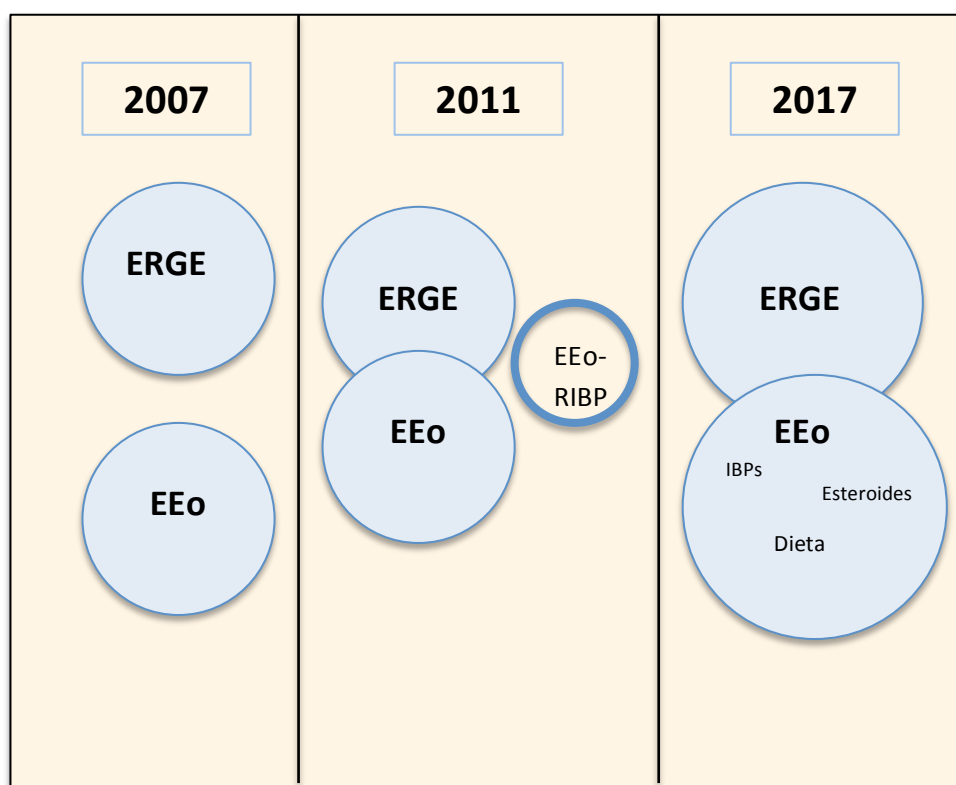


Figura 4. Consideraciones sobre la relación evolutiva entre la ERGE, la EEO y la respuesta al tratamiento con IBPs. ERGE; IBP; EEO-RIBP. Modificado de: Manuel-Infante J et al. Proton pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia: still a valid diagnosis? Curr Opin Gastroenterol. 2017 Apr 25

3.4. Diagnóstico

El diagnóstico de EEO es clínico e histológico. Sin embargo la presencia de disfunción esofágica y el aumento de eosinófilos en la mucosa esofágica (≥ 15 eos/CGA) no son exclusivos de la EEO. Las patologías que deben formar parte del diagnóstico diferencial de un paciente con eosinofilia esofágica son: ERGE, esofagitis infecciosa (herpes, CMV, cándida), gastroenteropatía eosinofílica, síndrome hipereosinofílico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, acalasia, hipersensibilidad a medicamentos, vasculitis, enfermedades del tejido conectivo y reacción injerto contra huésped⁽⁸⁰⁾. El hallazgo de eosinófilos en el

esófago debe interpretarse en el contexto clínico en el que se obtuvo la biopsia con el fin de determinar su causa.

3.4.1. Manifestaciones clínicas

La EEO puede manifestarse mediante diversos signos y síntomas. La expresión sintomática y la forma de presentación clínica de la enfermedad varían de acuerdo a la edad del paciente. Los síntomas más comunes son los siguientes (40).

1. En el lactante pequeño el rechazo al alimento suele ser un síntoma frecuente, junto con vómitos y en ocasiones retraso ponderoestatural.
2. En pre-escolares y escolares predominan los síntomas de reflujo y de esofagitis, es decir: náuseas, vómitos, dolor retroesternal y dolor abdominal. Si existe disfagia, suele ser de comienzo insidioso, por ejemplo, para evitar los síntomas los pacientes se habitúan a ingerir líquidos tras la introducción del alimento, lo cual hace que el síntoma tienda a pasar desapercibido. Además, esto les ayuda a evitar la sintomatología y facilitar el paso del bolo alimenticio. Igualmente los pacientes desarrollan un hábito de alimentación pausado con masticación lenta y deglución forzada.
3. En adolescentes y adultos es más frecuente la disfagia aunque también se presentan con síntomas de RGE (Pirosis, dolor retroesternal y/o abdominal). La disfagia suele ser intermitente. La impactación esofágica de alimentos puede ser la forma de presentación de la enfermedad en estas edades.

Más allá de los síntomas gastrointestinales, puede existir también la expresión clínica del fenómeno inmunoalérgico en la forma de atopia: rinoconjuntivitis, asma, alergia alimentaria IgE mediada y dermatitis atópica. La eosinofilia periférica (≥ 450 -500 eosinófilos/ μ L) es también un hallazgo frecuente ⁽⁸¹⁾.

3.4.2. Diagnóstico endoscópico

Desde que se empezó a reconocer la EEO como una patología diferenciada, se han descrito varias características morfológicas en el esófago de los pacientes sometidos a endoscopia y se han propuesto diversos esquemas de clasificación de estos hallazgos; sin embargo, el aspecto endoscópico sólo contribuye a la sospecha diagnóstica de la EEO, ya que se necesita confirmación histológica con la toma de biopsias.

Un metanálisis realizado en 2012, analizó los hallazgos endoscópicos de 4.678 pacientes con EEO y 2.742 controles y estimaron la frecuencia de las siguientes características endoscópicas ⁽⁸²⁾:

- Surcos lineales: 33-48%. Erosiones lineales con aspecto de surco, ubicados en una mucosa edematosa, ensanchada hacia la luz.
- Anillos circulares fijos o traquealización esofágica: 44-55%. Anillos múltiples presentes en el esófago proximal a medial dándole la apariencia de una tráquea. Se asocian a fibrosis. Debe diferenciarse de la imagen de una formación en anillos transitoria del esófago que puede ocurrir durante la relajación del esfínter esofágico inferior o durante la deglución y que no implica cambios patológicos en el esófago.
- Atenuación del patrón vascular: 41%. En la endoscopia normal se transparentan los vasos subepiteliales. En la EEO, dicho patrón se ve atenuado, con pérdida de la definición de dichos vasos.
- Exudados blanquecinos: 27%. Pápulas blanquecinas pequeñas, también pueden ser visibles como representación de abscesos eosinófilos en la histología.

- Estenosis (particularmente estenosis proximales): 10-38%. Estrechamiento de la luz, única o múltiple, con dificultad para el paso del endoscopio.
- Estenosis completa: 9%. Esófago de mínimo calibre, debido a estenosis completa, con imposibilidad del paso del endoscopio y riesgo de ruptura, asociado a fibrosis histológica.
- Esófago normal: 7-32%. Este dato debe ser muy tenido en cuenta. Se recomienda la toma de biopsias en todos los pacientes sometidos a endoscopia, ya que la aparente normalidad de la visión macroscópica puede contrastar con eosinofilia histológica severa.
- Fragilidad de la mucosa: representada por friabilidad extrema de la mucosa, con sangrado ante el menor trauma. Dicho aspecto se designa como “mucosa en papel crepé”.

Aunque estos hallazgos endoscópicos parecen ser característicos de EEO, no todos los endoscopistas los reconocen ⁽⁸³⁾. Sin embargo, aunque la prevalencia de cualquier hallazgo individual puede ser variable, hasta el 83% de los individuos reportados en la literatura como EEO tienen al menos una característica endoscópica de las arriba mencionadas. La sensibilidad de los hallazgos endoscópicos individuales es moderada y aunque los valores de especificidad son más altos, los valores predictivos positivo y negativo resultan variables. Basado en esto y en el carácter parcheado de la inflamación mucosa se recomienda actualmente la obtención de 6 biopsias esofágicas, de al menos dos localizaciones entre esófago distal, medio y proximal, de todos los pacientes que presentan síntomas de EEO, independientemente de la apariencia endoscópica del esófago.

De acuerdo a la clasificación propuesta por Hirano y col (Tabla 1), tras ajustar para conseguir una mayor concordancia interobservador, se pueden definir como criterios mayores endoscópicos en el diagnóstico de EEO la presencia de los anillos concéntricos fijos, las pápulas o exudados blanquecinos, los surcos longitudinales, el edema y la estenosis. Se considera como único criterio menor la friabilidad de la mucosa (mucosa en papel crepé). Esta clasificación incluye además para cada criterio mayor y menor la posibilidad de establecer grados de severidad ⁽⁸⁴⁾.

Tabla 1. Nuevo sistema de clasificación endoscópica de la EEO

Criterios mayores

A. Traquealización

- Grado 0: ninguna
- Grado 1: leve (rebordes circunferenciales sutiles)
- Grado 2: moderado (anillos distintivos que no impiden el paso del endoscopio estándar de adultos)
- Grado 3: severo (anillos marcados que impiden el paso del endoscopio estándar de adultos)

B. Exudados algodonosos

- Grado 0: ninguno
- Grado 1: leve (<10% del área de superficie esofágica)
- Grado 2: severo (>10% del área de superficie esofágica)

Tabla 1. Nuevo sistema de clasificación endoscópica de la EEO

C. Surcos longitudinales

- Grado 0: ausentes
- Grado 1: presentes

D. Edema (pérdida de la vascularización)

- Grado 0: presencia vascular distintiva
- Grado 1: ausencia de relieves y marcas vasculares

E. Estenosis o estrechamiento esofágico

- Grado 0: ausente
- Grado 1: presente

Criterios menores

A. Esófago con mucosa en «papel crepé» (fragilidad)

- Grado 0: ausente
- Grado 1: presente

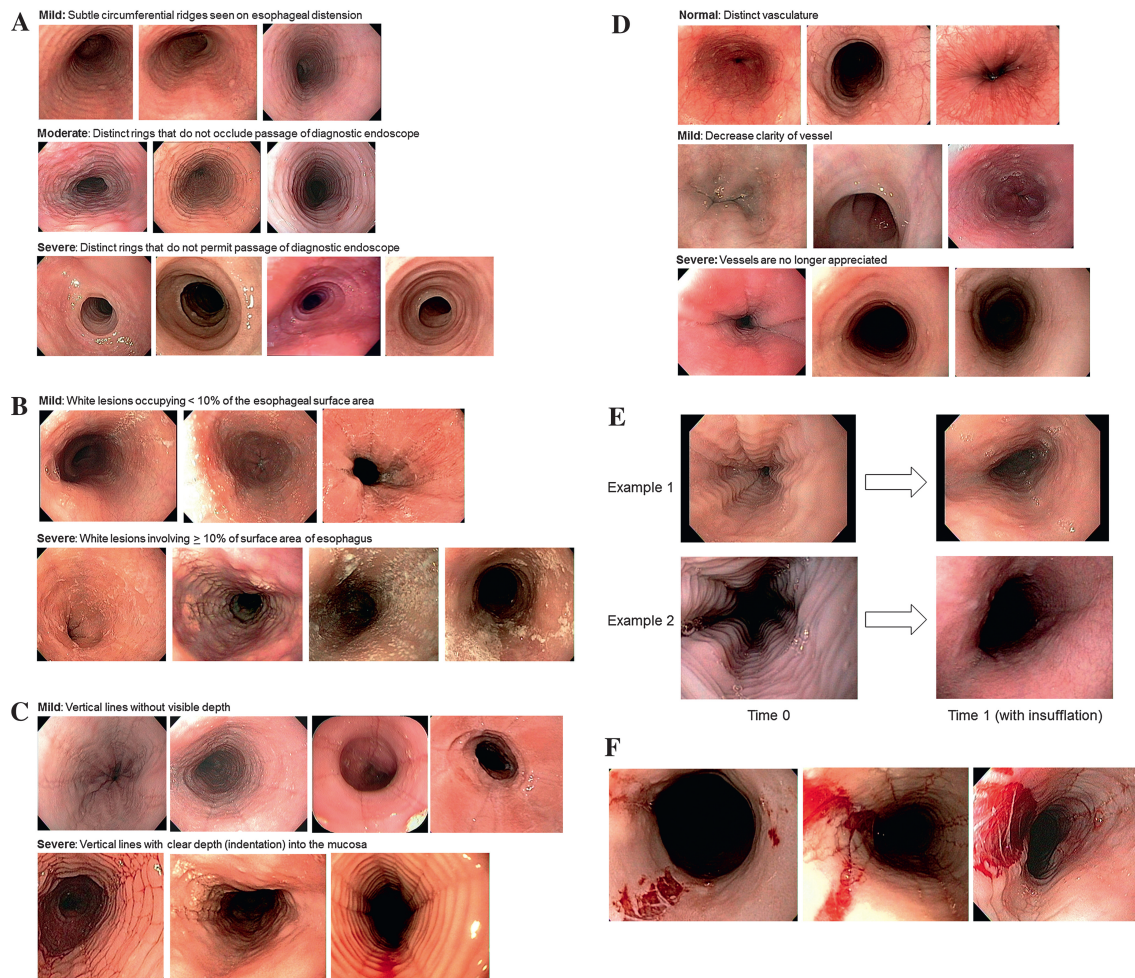


Figura 5. Atlas de referencia para el sistema de gradación endoscópica en la EEO propuesta por Hirano et al. Las categorías para cada característica están recogidas en la tabla 1. (A) Anillos fijos (traquealización, esófago en anillos, esófago corrugado). (B) Exudados (placas). (C) Surcos longitudinales. (D) Edema (atenuación de las marcas vasculares). (E) Anillos esofágicos transitorios no patológicos (esófago felino). (F) Esófago en papel crepé (fragilidad mucosa).

3.4.3. Diagnóstico histológico

Además del número máximo de eosinófilos ≥ 15 eos/CGA, la EEO presenta otras características anatomopatológicas, aunque ninguna patognomónica. Collins H et al han publicado recientemente un sistema de graduación de la intensidad y la extensión de la alteración en la mucosa esofágica en EEO. Se evalúan 8 características de la mucosa esofágica biopsiada: densidad de eosinófilos, hiperplasia de la zona basal, presencia de abscesos eosinofílicos, infiltración de eosinófilos en las capas superficiales, dilatación de los espacios

intercelulares, alteración de la superficie epitelial, células epiteliales disqueratósicas y fibrosis de la lámina propia ⁽⁸⁵⁾.

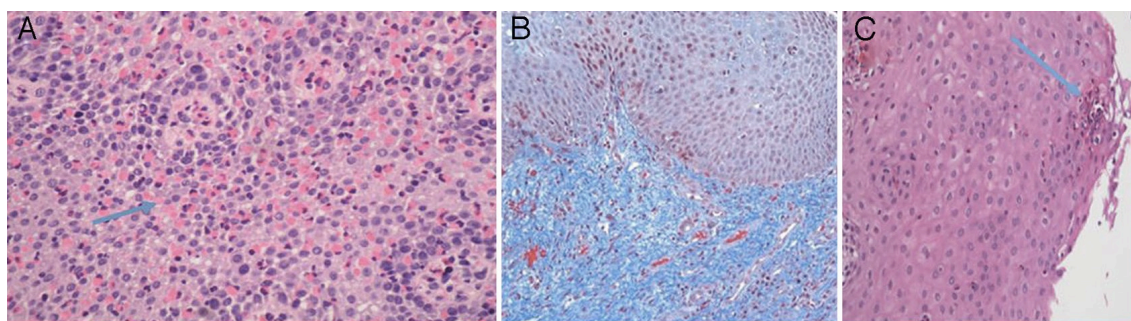


Figura 6. Imágenes de anatomía patológica de EEO (Hematoxilina-Eosina, x 200). A) infiltrado de más de 15 eosinófilos por campos de gran aumento; B) fibrosis subepitelial; C) microabsceso eosinofílico. Modificada de: Górriz-Gil et al. Acta Otorrinolaringol Esp 2016;67:167-78

3.5. Tratamiento

3.5.1. Inhibidores de la bomba de protones (IBPs)

El uso de IBP (omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, pantoprazol), como monoterapia, en pacientes con eosinofilia esofágica se utilizó inicialmente para descartar la ERGE como causa del infiltrado eosinofílico y posteriormente para confirmar el diagnóstico de EEO y clasificarla como EEO-RIBP o EEO no-RIBP. Como se ha comentado previamente, Molina Infante J et al, proponen abandonar el uso de la designación EEO-RIBP dado que los pacientes incluidos en esa entidad presentan características fenotípicas, moleculares, patogénicas y terapéuticas indistinguibles de aquellos con EEO que no responden a IBP, por lo que deberían ser incluidos dentro del espectro de EEO y no como una entidad aparte ⁽⁷⁹⁾. La dosis recomendada es de 1 mg/kg por dosis, dos veces al día, durante ocho semanas (máximo 80 mg al día). Se debe realizar una segunda endoscopia digestiva alta bajo terapia con IBP para evaluar la respuesta endoscópica e histológica, aunque los síntomas hayan mejorado. Si el infiltrado eosinofílico persiste y se han descartado otras causas de eosinofilia

esofágica, deben plantearse otras opciones terapéuticas. Si el infiltrado eosinofílico ya no alcanza los criterios de EEO, el tratamiento debe dejarse a las dosis de mantenimiento de IBP (1mg/kg/día) en 2 dosis. La duración y los controles endoscópicos evolutivos no están claramente definidos aunque Gutiérrez-Junquera C. et al estudiaron la respuesta a IBP en una población de 51 pacientes pediátricos con EEO y, tras confirmar la respuesta histológica a IBP (Esomeprazol) en el 68% de los niños, mantuvieron el tratamiento de mantenimiento hasta un año con control endoscópico posterior en 14 de ellos, de los que 11 continuaban en remisión ⁽⁸⁶⁾.

3.5.2. Tratamiento dietético

La EEO responde a la eliminación de antígenos de la dieta, que como se ha mencionado en niños sería la terapia de elección, aunque no siempre posible. En la EC, la mayoría de pacientes responden a la dieta sin gluten. En la EEO sin embargo no existe un único antígeno ni una combinación fija de antígenos responsables de la respuesta inmune; cada paciente presenta un patrón de respuesta antigénica distinta, que además puede variar a lo largo de la evolución de la enfermedad. Por este motivo el tratamiento dietético es complejo. Las tres modalidades de terapia nutricional recomendadas en EEO se definen de la siguiente manera ⁽⁸⁷⁾:

- Dieta elemental: incluye el uso exclusivo de fórmulas que contienen aminoácidos cristalinos libres.
- SFED (“six-food elimination diet” o dieta de los seis alimentos): en la cual los pacientes evitan de forma empírica los seis alimentos alergénicos más comunes (leche, trigo, huevo, legumbres, frutos secos y pescado/mariscos), independientemente de los resultados de las pruebas de alergia.

- Dieta dirigida (en función de los resultados del test de alergia). La eliminación de los alérgenos alimentarios más ofensivos se implementa mediante una de las opciones antes mencionadas por un período de 6-8 semanas seguido de endoscopia y biopsias esofágicas de control. Si bien las pruebas cutáneas pueden orientar el tratamiento dietético, la reintroducción posterior y las pruebas de provocación se hacen en base a criterios clínicos.

Existen algunas variantes que se aplican en la práctica clínica, como la combinación de la dieta dirigida por los test de alergia en combinación con la indicación de evitar los seis alimentos alérgicos más comunes. Recientemente se han propuesto otras formas de abordar los tratamientos dietéticos: realizando un tratamiento escalonado en ascenso de 2-4-6 alimentos o grupos de alimentos, es decir eliminando inicialmente leche de vaca y trigo, y si esto no es eficaz, añadir huevo y soja/leguminosas para terminar, si persiste la inflamación, con la eliminación de los 6 grupos de alimentos. Con esta estrategia se evitan dietas innecesarias y se reduce el número de endoscopias (88, 89).

En la práctica estas dietas son complicadas de seguir. Cuando se completan las 6-8 semanas de terapia dietética, está indicada la realización de una endoscopia para comprobar el estado de la mucosa esofágica. Es frecuente que el paciente se encuentre asintomático pero persista la actividad inflamatoria. Si la mucosa se ha recuperado, entonces se reintroducen de forma seriada los grupos de alimentos eliminados, seguidos de una endoscopia correspondiente a cada reintroducción alimentaria hasta establecer los alimentos que desencadenan la inflamación y descartar los que no. Es vital que

en este proceso los pacientes y sus familias reciban apoyo dietético, idealmente con la supervisión de un dietista ⁽⁹⁰⁾. La calidad de vida en relación especialmente a las actividades sociales, se ve afectada en una gran proporción de pacientes. Los niños y sus familias se benefician de un manejo multidisciplinar donde el psicoterapeuta juega un papel muy relevante ⁽⁹¹⁾.

El éxito del tratamiento dietético dependerá de la adherencia al mismo, que a su vez está determinado por la accesibilidad a un seguimiento profesional por un dietista y por la palatabilidad de los productos, el coste ⁽⁹²⁾, la cobertura de terceros y el efecto del tratamiento sobre la calidad de vida ⁽⁹⁰⁾.

De las tres opciones dietéticas, la dieta elemental y la SFED son las más efectivas, consiguiendo remisión histológica en el 90,8% y el 72,1% de los pacientes con EEO según un reciente metanálisis. Sin embargo y pese a la superioridad de la dieta elemental en cuanto a eficacia, en la práctica clínica podría considerarse que la SFED representa un mejor abordaje dietético para el tratamiento de pacientes con EEO, tanto niños como en adultos y jóvenes motivados, dada la dificultad de mantener una dieta elemental exclusiva ⁽⁹³⁾.

3.5.3. Esteroides sistémicos

El uso de esteroides sistémicos en el tratamiento de la EEO fue evaluado por primera vez en 1998 en 20 niños que recibieron metilprednisolona a razón de 1,5 mg/ kg/día en dos dosis durante cuatro semanas. El descenso de la dosis fue paulatino hasta alcanzar las seis semanas. Todos menos un paciente presentaron mejoría clínica a la semana de tratamiento y mejoría histológica completa en cuatro semanas. A los doce meses de seguimiento el 50% de los pacientes estaba asintomático. Dos pacientes recibieron un segundo pulso de

metilprednisolona, siete continuaron con tratamiento dietético con buena respuesta ⁽⁹⁴⁾. Los esteroides sistémicos son muy eficaces para el control de síntomas y la remisión histológica de la EEO, sin embargo, su uso presenta importantes efectos adversos por lo que se reservaba para pacientes graves que presentaban síntomas severos: disfagia severa con intolerancia a la vía oral, pérdida rápida de peso o previo a la dilatación esofágica⁽⁴⁰⁾. En la actualidad prácticamente no se utiliza y se prefiere combinar otros tratamientos antiinflamatorios (IBP, dieta o corticoides deglutidos).

3.5.4. Esteroides tópicos

Múltiples estudios clínicos han evaluado la eficacia terapéutica de los esteroides tópicos (deglutidos): budesonida (viscosa y en MDI) y fluticasona en MDI deglutidas. Es importante reseñar que no hay ningún fármaco en el mercado con corticoides en preparación para deglutir. En EEO se usan preparados adaptados de la medicación utilizada para el asma.

- Budesonida oral viscosa vs. budesonida en MDI deglutida

Diversos estudios avalan la seguridad y la eficacia de la BOV ^(95, 96). Dellon et al. publicaron un estudio comparando el uso de BOV vs Budesonida en MDI deglutida en veintidós pacientes adultos. Se evaluó la distribución del fármaco y su eficacia terapéutica. La BOV demostró una mayor presencia del fármaco a nivel del esófago y una mayor reducción en el número de eosinófilos. La respuesta sintomática fue semejante y equiparable en ambos grupos ⁽⁹⁷⁾.

- Budesonida oral viscosa y dosificación

En el 2015, Gupta et al han evaluado a setenta y un pacientes pediátricos en un estudio randomizado y prospectivo, comparando el tratamiento con una

formulación de BOV vs placebo. Se aleatorizaron en grupos con distinta dosis y posología (0,35-4mg/día en una o dos dosis diarias). Se evaluaron tres esquemas de tratamiento (dosis alta, media y baja). La respuesta combinada clínica e histológica (criterios de valoración primarios) fue mayor en los grupos que recibieron dosis medias o altas en comparación con el grupo placebo o aquellos que recibieron dosis bajas. La respuesta histológica fue significativamente mayor en los grupos de dosis media (52,6%, $p=0,009$) y alta (94%, $p<0.001$), pero no en el grupo de dosis baja (23,5 vs 5,6% en el grupo placebo, $p=0,1786$). Comprobaron que las dosis altas promueven una mayor reducción de la densidad de eosinófilos que las dosis medias. No hubo diferencias significativas en la evolución y en el registro de los síntomas en los diferentes grupos estudiados ⁽⁹⁸⁾.

- Budesonida en el mantenimiento de la remisión

Straumann et al evaluaron el efecto de la Budesonida en MDI deglutida en el mantenimiento de la remisión en un estudio prospectivo, randomizado, doble ciego. Veintiocho pacientes adultos con EEO en remisión fueron tratados con Budesonida MDI (250 µg x 2/d) vs placebo durante cincuenta semanas. En ambos grupos hubo aumento del número de eosinófilos, pero éste fue más acentuado en el grupo placebo. No hubo diferencias significativas en la respuesta clínica entre ambos grupos ⁽⁹⁹⁾.

- Fluticasona propionato en MDI deglutida (FP) para la inducción de la remisión

Konikoff et al llevaron a cabo un estudio randomizado, prospectivo, doble ciego, en pacientes pediátricos con EEO utilizando FP, a dosis de 440 µgx2/día (n=21)

vs placebo (n=15) durante tres meses ⁽¹⁰⁰⁾. Se definió la remisión histológica como la presencia de < 1 Eos/CGA tras el tratamiento. Completaron el estudio 31 pacientes (veinte en el grupo de fluticasona y once en el grupo placebo). Se alcanzó la remisión total en el 50% de los pacientes del grupo tratado con FP vs 9% del grupo placebo (p= 0,047). Otros parámetros como mejoría parcial o simplemente reducción de la eosinofilia esofágica también fueron registrados en el grupo con FP, con una mejoría significativa de los vómitos y un caso de candidiasis. En los casos en que el tratamiento con FP fue efectivo, se evidenció una disminución en el número de LT CD8(+) y mastocitos tanto en esófago proximal como distal (p < 0,05).

Los pacientes considerados respondedores fueron siempre más jóvenes y de menor estatura. Los autores especulan que una dosis única pudiese resultar insuficiente en los pacientes más altos ya que sus esófagos tienden a ser más largos.

- FP vs esteroide sistémico

Schaefer et al compararon el efecto de FP vs Prednisona (P) oral en pacientes pediátricos a través de un estudio prospectivo, abierto y randomizado ⁽¹⁰¹⁾. Fueron evaluados cuarenta pacientes en cada grupo. Los del grupo P recibieron una dosis de 1mg/kg (máximo 30 mg) y los del grupo FP (220µg, cuatro veces al día si la edad era de 1-10 años o 440 µg, cuatro veces por día si era de 11-18 años) durante cuatro semanas, seguidos de una reducción progresiva de la dosis a lo largo de doce semanas. Dieciocho pacientes del grupo P y veintiuno del grupo FP completaron el estudio: 81% y 50% respectivamente, presentaron remisión histológica a las 4 semanas de

tratamiento ($p < 0,001$). Hubo una mejoría sintomática a las cuatro semanas del 100% en el grupo P y del 97% en el grupo FP. El 40% de los pacientes del grupo P presentaron efectos secundarios sistémicos relacionados con la terapia esteroidea y el 15% del grupo FP presentó esofagitis por *Candida*.

- Budesonida vs Fluticasona deglutidas.

No existen estudios prospectivos que comparen la eficacia de Fluticasona frente a Budesonida. En el 2016 Albert et al, concluía que no existían diferencias en la eficacia de ambos corticoides deglutidos en un estudio con población pediátrica y de adultos con EEO ⁽¹⁰²⁾. Recientemente Fable et al han revisado de forma también retrospectiva la eficacia de ambos esteroides tópicos en niños con EEO, encontrando que la BOV consigue una respuesta endoscópica e histológica mayor que la FP (75% vs 40% respectivamente, $p = 0.0059$) ⁽¹⁰³⁾.

Muralli et al realizaron un meta-análisis con revisión sistemática de los ensayos aleatorizados doble ciego que comparaban esteroides tópicos vs placebo y concluyeron que el tratamiento con corticoesteroides tópicos parece ser más efectivo que el placebo en inducir la remisión histológica, pero no está claro que tengan un impacto en la mejora de la sintomatología de la EEO. Son necesarios estudios con mayor tamaño muestral y con criterios de mejoría clínica uniformemente validados para poder determinar este efecto ⁽¹⁰⁴⁾.

Al no existir una buena correlación entre la mejoría sintomática y la remisión histológica es necesario que la evaluación post-tratamiento incluya siempre la realización de una endoscopia y estudio de AP con biopsias de control.

En cuanto a la duración del tratamiento, la mayoría de los estudios sugieren una duración promedio de doce semanas. Si la respuesta clínica, endoscópica e histológica es satisfactoria, se recomienda iniciar terapia de mantenimiento que puede llevarse a cabo con dieta o disminuyendo progresivamente la dosis del esteroide hasta alcanzar y mantener en el tiempo una dosis mínima capaz de garantizar una remisión sostenida.

- Esteroides tópicos y efectos adversos

Por lo menos, 15-20% de los pacientes que reciben esteroides tópicos desarrollan candidiasis esofágica, que responde fácilmente al tratamiento médico.

Actualmente es controvertido el efecto de los esteroides tópicos sobre la función adrenal. Algunos estudios con escaso tamaño muestral y distintas técnicas para evaluar el eje adrenal en pacientes con EEO tratados con esteroides tópicos sugieren monitorizar la función adrenal mediante test de ACTH tras describir una incidencia variable de 10-65% de respuesta insuficiente del cortisol sin manifestaciones clínicas ^(105, 106).

3.5.5. Terapias biológicas

Como se ha puesto de manifiesto, no existe en la actualidad un tratamiento universal de la EEO. Ni siquiera el tratamiento dietético exitoso garantiza el control de la inflamación de forma permanente. Tanto los IBPs como los esteroides tópicos son tratamientos en los que aún no se ha definido el tiempo ni los efectos secundarios a largo plazo, por lo que de momento no existe una recomendación para su prescripción de forma indefinida. En este contexto se están investigando otras terapias con fármacos biológicos.

- Reslizumab

Reslizumab es un anticuerpo anti-IL-5 que ha sido evaluado en pacientes con EEO. La IL-5, como se ha comentado previamente, es una citoquina de tipo Th2 que juega un papel fundamental en la proliferación, diferenciación, supervivencia y activación de los eosinófilos en condiciones alérgicas crónicas, así como en el reclutamiento de los mismos hacia tejidos en respuestas inflamatorias.

En un estudio doble ciego controlado con placebo, un grupo de niños y adolescentes con diagnóstico de EEO fueron tratados con Reslizumab endovenoso a dosis de 1 a 3 mg/kg y distribuidos en cuatro grupos. Se observó una significativa reducción del recuento de eosinófilos en todos los grupos tratados en comparación con el grupo placebo. Sin embargo, la evaluación global final de los resultados fue similar en todos los grupos. Los efectos adversos observados fueron similares a todos los agentes biológicos: cefaleas, congestión nasal, tos e infecciones de vías aéreas superiores ⁽¹⁰⁷⁾.

- Mepolizumab:

El Mepolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra la IL-5 que tiene un papel similar al Reslizumab en el tratamiento de la EEO. Straumann et al. ⁽¹⁰⁸⁾ realizaron un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego (piloto) en once adultos con EEO comparando Mepolizumab vs placebo sin obtener una diferencia significativa en la mejoría sintomática entre ambos grupos. No obstante, se observó una mayor reducción en el recuento eosinofílico esofágico con Mepolizumab vs placebo (67% vs 25%, $p=0,003$). Sin embargo, Garrett et al. ⁽¹⁰⁹⁾ habían estudiado previamente en cuatro pacientes con síndrome

hipereosinofílico los efectos benéficos del Mepolizumab (10 mg/kg con intervalos de cuatro semanas) demostrando mejoría sintomática, endoscópica como en la disminución del infiltrado eosinofílico.

Se han evaluado otros fármacos en pacientes con EEO: Ciclesonide, Omalizumab, Infliximab, Montelukast, Cromoglicato, 6-Mercaptopurina, Azatioprina y anticuerpos monoclonales anti-IL-13 (QAX576). No existen hasta la fecha estudios controlados o evidencia suficiente que permita hacer recomendaciones formales en relación al uso de estos fármacos en pacientes con EEO.

4. Enfermedad celíaca.

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía mediada por el sistema inmune que se activa por la ingestión del gluten de trigo y proteínas similares, de cebada, centeno y, probablemente, avena ^(110, 111), en individuos genéticamente susceptibles. Distintos estudios en diferentes poblaciones han evidenciado una prevalencia estimada en torno al 1% de la población ⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾, aunque sólo 1 de cada 7-10 de estos individuos están diagnosticados.

4.1. Inmunopatogenia de la EC.

En la EC la interacción entre factores genéticos y ambientales lleva a la pérdida de tolerancia oral a las proteínas del gluten ⁽¹¹⁵⁾. El término gluten se refiere a un grupo de proteínas de trigo (gliadinas y gluteninas), y sus homólogos en la cebada y centeno, denominadas prolaminas por su alto contenido en los aminoácidos glutamina y prolina. La deficiencia en proliendopeptidasas de las enzimas contenidas en el jugo gástrico, pancreático y aquellas que forman parte del borde en cepillo, impiden su degradación. Como resultado, se

originan péptidos de gran tamaño que no son capaces de atravesar el epitelio intestinal y se acumulan en el lumen. Se han identificado dos tipos de péptidos de las proteínas del gluten ⁽¹⁾:

- Péptidos inmunogénicos, que estimulan linfocitos T del intestino o sangre periférica de los pacientes celíacos con restricción DQ2/DQ8 ⁽¹¹⁶⁾.
- Péptidos tóxicos, de acción directa sobre el epitelio e independiente de los linfocitos T ⁽¹¹⁷⁾.

No todos los cereales contienen la misma proporción de péptidos de cada tipo, ni la misma cantidad relativa de gluten, de ahí las variaciones en su capacidad patogénica.

La presencia de agentes endógenos y exógenos que afectan la integridad de la permeabilidad intestinal, permite el paso de estos péptidos a la lámina propia donde serán sustrato de la enzima TG2 que modifica los residuos de glutamina por glutamato. Estos péptidos modificados enzimáticamente poseen carga negativa lo que les confiere alta afinidad por las moléculas HLA-DQ2 y DQ8 expuestas en las células presentadoras de antígenos (APC). Los heterodímeros HLA-DQ2 y DQ8 presentan las proteínas del gluten a los linfocitos T CD4+ específicos ⁽¹¹⁸⁾, y son responsables de la acción directa del gluten sobre el epitelio ^(119, 120). La inflamación mucosa y el desarrollo de la lesión intestinal son secundarios a la activación secuencial de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, que conducen a la alteración de la producción local de citocinas por parte de los linfocitos T CD4+ ⁽¹²¹⁾⁽¹²²⁾ desencadenando una respuesta Th1, caracterizada por la producción de anticuerpos anti-gliadina (AG) y anti-transglutaminasa-2 (ATG2), así como por la liberación de

interferón gamma (IF γ). El IF γ potencia la presentación de antígenos asociados al HLA y amplifica la fase de reconocimiento de la respuesta inmunitaria con lo cual aumenta la expresión de ligandos reconocidos por las células T ^(123, 124)

A modo de resumen, el modelo patogénico de la EC integraría:

- factores que actúan en el epitelio y en la LP, como la digestión incompleta del gluten y el transporte transepitelial de péptidos ⁽¹²⁵⁾
- el efecto tóxico directo del gluten sobre el epitelio
- la proliferación y activación de los LIEs ⁽¹²⁰⁾
- el reconocimiento de péptidos de gluten por linfocitos T específicos con restricción HLA-DQ2 tras ser modificados por la transglutaminasa tisular (TG2) ⁽¹²³⁾.

Como se ha comentado, la EC está fuertemente asociada con genes HLA (locus CELIAC1, cromosoma 6p21): la mayoría de los pacientes celíacos muestran una variante de la molécula HLADQ2 codificada por los alelos DQA1*05 y DQB1*02, y el resto son DQ8 (DQA1*03, DQB1*0302), o son portadores de algún alelo aislado del DQ2 ^(126, 127). Estos genes muestran un efecto dosis mediado por una presentación de péptidos, que es más eficaz en los homocigotos HLADQ2. Aunque el 20-30% de la población es portadora de DQ2, sólo un 1% desarrolla la EC ⁽¹²¹⁾. Además la concordancia entre hermanos de idéntico HLA es aproximadamente del 30%, lo que indica la función de los genes no-HLA en la patogénesis de la enfermedad. Durante los últimos años, se han realizado numerosos esfuerzos para localizar e identificar genes de susceptibilidad no localizados en la región HLA que puedan explicar la genética de la EC. Para ello, se han utilizado fundamentalmente dos métodos de análisis: los estudios de ligamiento en familias y los estudios de

asociación. Recientemente, se ha investigado la EC mediante estudios de asociación de genoma completo (Genome Wide Association Studies, GWAS), en los cuales se han analizado miles de polimorfismos de un único nucleótido o SNPs. Gracias a estos estudios, se han identificado varios genes asociados a la EC, pero no todas las asociaciones observadas se han confirmado en estudios posteriores.

Estos genes codifican para moléculas mediadoras de la respuesta inmune, como citoquinas pro-inflamatorias, moléculas de expresión y proteínas que actúan como segundos mensajeros ⁽¹²⁸⁾.

Los estudios de asociación genómica indican que la asociación más fuerte se establece con las regiones 5q31-33 (CELIAC2) y 2q32 (CELIAC3). El locus CELIAC2 codifica para citoquinas relacionadas con la respuesta Th2 e interleuquinas ⁽¹²⁹⁾; mientras que el locus CELIAC3 codifica para las moléculas co-estimuladoras CTLA4 y CD28 en las células T activadas ⁽¹³⁰⁾.

El gen *Myosin IXB* ubicado en la región 19p13.1 se conoce como CELIAC4 ⁽¹³¹⁾. Este gen codifica para una variante de la proteína miosina (poco convencional) involucrada en la remodelación del citoesqueleto en los enterocitos epiteliales. Esta variante proteica influye en el aumento de la permeabilidad entre las células epiteliales y el consecuente paso de los péptidos inmunogénicos del gluten. Su papel en los trastornos iniciales en la respuesta inmune al gluten también se ha propuesto en otras enfermedades inflamatorias intestinales ^(132, 133). Sin embargo y pese a todo el avance en los conocimientos sobre la patogenia de la EC, otros factores no sólo genéticos, sino también ambientales parecen determinar la capacidad individual de inducción y control de la respuesta innata, y de susceptibilidad del individuo.

4.2. Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca.

La sospecha de enfermedad celíaca comienza con la presentación clínica del paciente. En la tabla 2 se recogen los síntomas más frecuentes asociados a EC según la edad. Hay que tener en cuenta como ya se ha dicho que sólo 1 de cada 7-10 pacientes con EC se diagnostica, muchos de los que no se diagnostican se encuentran asintomáticos. También pueden estar asintomáticos los pacientes de riesgo por patología asociada (enfermedades autoinmunes como diabetes mellitus tipo I, tiroiditis autoinmune, EII..., trastornos neurológicos o psiquiátricos como encefalopatía progresiva, miastenia gravis, esclerosis múltiple, esquizofrenia...u otros síndromes como S. de Down, S. de Turner...) o por familiares de primer grado afectados. En todos ellos se recomienda despistaje de EC.

Tabla 2. Presentación clínica de la enfermedad celíaca según edad			
Síntomas	Niños	Adolescentes	Adultos
	<ul style="list-style-type: none">-Diarrea-Anorexia-Vómitos-Dolor abdominal-Irritabilidad-Apatía-Tristeza-Laxitud-Introversión-Hipotonía	<ul style="list-style-type: none">-Frecuentemente asintomáticos-Dolor abdominal-Cefaleas-Artralgias-Menarquia retrasada-Irregularidades menstruales-Estreñimiento-Hábito intestinal irregular-Discomfort abdominal	<ul style="list-style-type: none">-Dispepsia-Diarrea crónica-Dolor abdominal-Síndrome de intestino irritable-Vómitos-Estreñimiento-Astenia-Dolores articulares y óseos-Infertilidad-Abortos recurrentes-Parestesias-Tetania-Ansiedad, depresión-Irritabilidad-Epilepsia-Ataxia

Signos y alteraciones analíticas	<ul style="list-style-type: none"> -Malnutrición -Distensión abdominal -Hipotrofia muscular -Retraso ponderoestatural -Ferropenia -Anemia ferropénica -Hipoproteinemia -Hipertransaminasemia 	<ul style="list-style-type: none"> -Aftas orales -Hipoplasia del esmalte -Distensión abdominal -Debilidad muscular -Talla baja -Artritis -Osteopenia -Ferropenia -Anemia ferropénica -Hipertransaminasemia -Queratosis folicular -Pérdida de peso -Alteraciones de la piel y dentición 	<ul style="list-style-type: none"> -Aftas orales -Malnutrición -Pérdida de peso -Edemas -Talla baja -Neuropatía periférica -Miopatía proximal -Ferropenia -Anemia ferropénica -Anemia megaloblástica -Hipertransaminasemia -Hipoesplenismo -Ostopenia -Disminución del tiempo de protrombina -Déficit de ácido fólico -Déficit de vit. B12 -Hipoalbuminemia
---	--	---	--

La confirmación diagnóstica de la EC se basa en la valoración clínica junto con los siguientes marcadores: 1) alteraciones en la mucosa duodenal mediante el estudio anatomopatológico, 2) susceptibilidad genética (HLA-DQ2/DQ8) y 3) anticuerpos específicos en el suero de los pacientes (ATG2 y AEm) junto con la determinación de IgA, ya que si existe déficit de la misma, las determinaciones de anticuerpos se harán para IgG ^(115, 134). En pacientes menores de 2 años la sensibilidad de los ATG2 es baja por lo que al estudio se debe añadir la determinación de los anticuerpos anti-péptido deaminados de gliadina (AAPDG). Hasta hace poco, las recomendaciones para el diagnóstico de la EC en niños (ESPGHAN 1990) se basaban en la realización, al menos, de una primera biopsia intestinal cuando el paciente tomaba gluten, siendo en algún caso necesario para confirmar definitivamente el diagnóstico la realización de una segunda o incluso una tercera biopsia y de una prueba de provocación con gluten ⁽¹³⁵⁾. En las nuevas recomendaciones ⁽¹³⁶⁾ se establece que en algunos casos de niños sintomáticos y con unos datos analíticos concluyentes (ATG2

muy elevados (más de 10 veces el valor de referencia del laboratorio que lo realiza) junto con anticuerpos AEm positivos y HLA de riesgo, realizados en laboratorios expertos, el especialista podría establecer el diagnóstico de EC sin necesidad de biopsia. Sin embargo, la biopsia intestinal, además de los estudios de morfometría para confirmar o no la lesión, puede aportar información adicional de utilidad aún en ausencia de lesión atrófica (depósitos de IgA ATG2, recuentos de LIEs por citometría de flujo). Hay que tener en cuenta que algunos de los síntomas de la EC en la infancia pueden deberse a otras patologías, y el diagnóstico de los adultos plantea otros problemas, en especial cuando los niveles de anticuerpos séricos son negativos. La sensibilidad de las pruebas serológicas es muy baja cuando la lesión intestinal es leve. Los nuevos criterios tampoco tendrían en cuenta el efecto de la dieta sin gluten, que puede aportar información relevante en los casos dudosos. Finalmente, la presencia de marcadores genéticos de riesgo positivos, no quiere decir que el individuo vaya a desarrollar necesariamente la enfermedad. La atrofia de las vellosidades ha sido considerada durante muchos años como el cambio principal para hacer el diagnóstico de EC ⁽¹³⁷⁾. El reconocimiento posterior de alteraciones más leves, fue importante para entender las características histológicas de la enfermedad, especialmente el infiltrado inflamatorio del epitelio y de la LP ^(138, 139). Marsh clasificó los patrones histológicos a partir del daño de la mucosa del intestino delgado, posteriormente modificado por Oberhuber. Es una clasificación corta y precisa de la lesión intestinal, que es útil tanto en el diagnóstico inicial como en el seguimiento (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de Marsh-Oberhuber

Tipo de lesión	Descripción
TIPO 0: mucosa normal	No hay signos de enfermedad. Histológicamente, se considera una mucosa normal cuando podemos observar al menos 4 vellosidades normales “en dedo de guante” seguidas en fila en el mismo corte histológico.
TIPO 1: lesión infiltrativa	Se caracteriza por una mucosa con arquitectura normal que presenta como único hallazgo significativo un incremento de LIEs. Se observa en pacientes con EC que siguen una dieta sin gluten (DSG) e indica que están ingiriendo mínimas cantidades de gliadina o que el paciente aún no está en remisión completa. También se describe en pacientes con EC potencial, con serología positiva pero asintomáticos. Esta fase no es diagnóstica de la enfermedad.
TIPO 2: lesión hiperplásica	Se caracteriza por una arquitectura vellositaria normal, con incremento de LIE y con hiperplasia críptica. Este tipo es muy raro de ver en biopsia y únicamente se ha observado en estudios experimentales o en pacientes con dermatitis herpetiforme.
TIPO 3: lesión destructiva	Son lesiones diagnósticas de enfermedad celíaca. Aunque el incremento de LIE es un criterio obligado para este tipo de lesión, en raras ocasiones puede ser normal, si el paciente acaba de comenzar la DSG. Puede dividirse en 3 subgrupos en base al grado de atrofia, modificación de Oberhuber: Tipo 3a: atrofia vellositaria leve; Tipo 3b: atrofia vellositaria marcada; y Tipo 3c: mucosa plana (atrofia vellositaria total).

Además de la EC, hay otros procesos en los que se puede observar una morfología similar a la EC temprana que presenta arquitectura vellositaria normal y aumento de LIE (> 25% del total de CEI), como la alergia no IgE mediada a alimentos ^(140, 141)(proteínas de la leche, arroz, pollo, pescado, otros cereales), la presencia de infecciones como las debidas a *Helicobacter pylori*, la giardiasis y la criptosporidiosis ^(17, 142). Aunque la atrofia de las vellosidades ha sido considerada como una de las alteraciones más características para el diagnóstico de EC, existen también otras enfermedades con estas alteraciones que requieren un diagnóstico diferencial (enteropatía autoinmune, enteropatía alérgica). Por ello es importante disponer de técnicas diagnósticas que complementen el diagnóstico anatomopatológico.

4.3. Linfograma intraepitelial por citometría de flujo en EC.

Como nos describe Roy G ^(14, 15, 17, 18, 143-151), la primera respuesta inmune frente a los antígenos de la dieta tiene lugar a nivel del epitelio de la lámina propia. El papel de los linfocitos de la lámina propia (LPL) parece más claro que el de los linfocitos intraepiteliales (LIE), a pesar de que variaciones en los subtipos LIE y el aumento global de los mismos son hallazgos constantes en la EC. De hecho, la primera anormalidad detectable en la EC es el aumento de los linfocitos T $\alpha\beta$ y LIE $\gamma\delta$, coincidente con un estadio inicial de linfocitosis histopatológica ⁽¹⁵²⁾. El aumento en el porcentaje de LIE en el epitelio se debe en parte a un aumento en la proliferación de LIEs $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ ⁽¹⁵³⁾ y, en parte, a una reducción de las células epiteliales en el estadio de acortamiento vellositario ⁽¹⁷⁾. Este aumento de linfocitos LIE CD3+ es también el primer evento detectable tras la provocación con gluten. El aumento de LIE $\gamma\delta$ ⁽¹⁵⁴⁾ se considera casi patognomónico de la EC y es susceptible de cuantificación, clásicamente por

técnicas de inmunohistoquímica y, más recientemente, por citometría de flujo (17). Sin embargo, mientras que el aumento de los LIE $\alpha\beta$ se correlaciona con la actividad de la enfermedad y se normaliza con una dieta sin gluten (DSG), el aumento de los LIE $\gamma\delta$ permanece constante en términos relativos: mientras estas células suponen un 10% de todos los LIEs en la mucosa intestinal sana, representan en torno a un 25% en la mucosa celíaca en todas las fases de la enfermedad. El aumento de LIE $\gamma\delta$ no es totalmente específico de EC, ya que también se ha hallado ocasionalmente en otras enteropatías, como la asociada a la leche de vaca ⁽¹⁵⁵⁾, alergia a alimentos ⁽¹⁵⁶⁾, criptosporidiasis, giardiasis ⁽¹⁵⁷⁾, síndrome de Sjögren ⁽¹⁵⁸⁾ y déficit de IgA ⁽¹⁵⁹⁾. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con estos procesos el aumento de LIE $\gamma\delta$ suele ser transitorio y moderado. En otras ocasiones puede corresponderse con un paciente con EC potencial o latente. El aumento de los LIE $\gamma\delta$ no es habitual en otras enteropatías más comunes, y podemos concluir que la EC es la enteropatía que cursa con un aumento sistemático, permanente e intenso, de esta población celular ⁽¹⁶⁰⁾. Además, el aumento de LIE $\gamma\delta$ se observa en todas las fases de la enfermedad, lo que hace que este parámetro sea muy útil en el diagnóstico de las formas potenciales y latentes. Otra anomalía descrita en las subpoblaciones LIE en la EC es el descenso de los linfocitos CD3– CD103+ LIE NK-like ⁽¹⁵⁴⁾. La determinación combinada de los subtipos LIE $\gamma\delta$ y CD3– confiere especificidad al estudio anatomopatológico en la EC ⁽¹⁷⁾. La subpoblación NK-like o CD3– LIE se estudia de forma óptima por citometría de flujo, dado que estas células carecen de marcadores específicos y precisan de una tinción multicolor para su identificación. Los LIE CD3– son numéricamente el segundo subtipo celular más representativo en un epitelio de la mucosa

sana: $50,25 \pm 2,57\%$ en niños < 3 años, $28,28 \pm 2,23\%$ en sujetos >3 años (media \pm error estándar de la media) y llegan a ser prácticamente indetectables en la EC activa. Dentro de la subpoblación LIE CD3–, pueden encontrarse varios subtipos celulares: células T precursoras y células NK y, ocasionalmente, linfocitos oligoclonales CD3– LIE pre-malignos en la EC refractaria. La razón de su desaparición del epitelio en todas las fases de la EC activa (incluyendo las formas latentes y potenciales, aunque reaparecen en un bajo porcentaje tras la dieta sin gluten), es desconocida.

El análisis por citometría de flujo de 3 parámetros en la población de LIE ($\alpha\beta$, $\gamma\delta$ y CD3–), denominado “infograma intraepitelial LIE, tiene alta especificidad y sensibilidad en el diagnóstico clínico de EC, y es particularmente útil en las presentaciones atípicas.

Resumiendo, se han descrito 3 alteraciones en las poblaciones de i-LIE en la EC:

- Aumento del porcentaje total de LIEs (en relación al total de células del epitelio (CEI) durante las fases activas de la enfermedad, que se corrige al excluir el gluten de la dieta.
- Aumento constante, independientemente de la ingestión o no de gluten, del porcentaje de LIE TcR $\gamma\delta$.
- Disminución constante, también independiente de la ingestión de gluten, del porcentaje de LIE CD3– CD7+ (NK-like).

Sin embargo y, a pesar de las excelentes sensibilidad y especificidad alcanzadas (sensibilidad del 94,4% y una especificidad del 94,9%), para

discutir el verdadero valor diagnóstico de esta prueba, es necesario tener en cuenta el hecho de que la EC es, posiblemente, la enfermedad que cuenta con unos mejores marcadores serológicos en sus presentaciones clásicas, de forma que los anticuerpos anti-endomisio (AEm) y, más recientemente, anti-transglutaminasa(aTG2), esta última, cuando se emplea el nuevo antígeno recombinante humano, muestran valores cercanos al 100% de especificidad y sensibilidad. Este hecho, obviamente, reduce la importancia clínica de todo nuevo parámetro añadido para su diagnóstico. Aún así la determinación de las subpoblaciones de LIEs puede realizar contribuciones relevantes al diagnóstico de la EC en la práctica clínica que se concretan en los siguientes puntos:

- Es una determinación que complementa al estudio anatomopatológico clásico aumentando su especificidad, dado que la atrofia de vellosidades y la hiperplasia críptica son alteraciones características, pero no específicas de la EC.
- Las alteraciones de las subpoblaciones de LIEs parecen ser extensivas a las formas latentes de la enfermedad en las que, tanto las alteraciones anatomopatológicas como los marcadores séricos, son de aparición inconstante.
- Es la única prueba que permanece alterada tras la exclusión del gluten de la dieta, por lo que su realización en las biopsias de control tras iniciar el tratamiento puede ayudar a minimizar la necesidad de la indicación de pruebas de provocación con gluten que, en la actualidad, son necesarias con frecuencia para alcanzar el diagnóstico de confirmación definitivo.

- Dado que el porcentaje total de LIEs se normaliza tras el tratamiento, la persistencia de un número elevado de estas células en la biopsia de control tras tratamiento debe ponernos en guardia y ayudar a detectar, muy sensiblemente, la existencia de transgresiones dietéticas. La determinación de las poblaciones de LIEs precisa de una única pieza de biopsia endoscópica, por lo que hay que resaltar que no interfiere en modo alguno con el estudio anatomopatológico clásico contribuyendo, además, a una mejor caracterización de las alteraciones inmunológicas que concurren en la enteropatía celíaca.

Por todo ello, el estudio de las variaciones de los LIE por citometría de flujo resulta ser una herramienta potente y eficaz que complementa el diagnóstico de EC.

En varios apartados de esta introducción se ha comentado el hallazgo en la mucosa intestinal de linfocitosis intraepitelial y del incremento de LIE y δ en la alergia alimentaria. La esofagitis eosinofílica EEO definida según el Instituto Nacional de enfermedades alérgicas e infecciosas (NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases) ⁽¹⁶¹⁾ como una alergia alimentaria gastrointestinal, en la que como se ha descrito previamente, predomina una respuesta celular no IgE mediada, inductora de un perfil de citocinas Th2, y dependiente de LTs ⁽¹⁶²⁾. La inflamación eosinofílica ocurre selectivamente en el esófago pero no se ha estudiado si existe una alteración del sistema inmune de la mucosa intestinal y no se han publicado estudios que relacionen los LIEs intestinales con esta patología. En esta tesis nos planteamos la utilidad de la citometría de flujo para caracterizar el linfograma intraepitelial intestinal en la EEO.

5. Esofagitis eosinofílica y enfermedad celíaca

La eosinofilia esofágica se ha considerado en algunos trabajos como una manifestación de la enfermedad celíaca. Se han publicado estudios en los que se sugería una asociación entre la EC y la esofagitis eosinofílica, aunque descrita de una manera inadecuada ⁽¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾. Se ha reportado una prevalencia de EEO en pacientes pediátricos con EC en un rango que varía entre 0-10%, mucho más alta que la prevalencia de EEO en la población general (22,7-50 casos/100000 habitantes). En la práctica clínica, mientras que la dieta sin gluten lleva a la resolución de los síntomas y de los marcadores de EC, en la EEO la dieta sin gluten no es capaz de resolver la disfunción esofágica en la mayoría de los pacientes con ambas patologías.

Recientemente Ari A. et al han estudiado las características clínicas y epidemiológicas de pacientes con ambas enfermedades o con EEO aislada y los han comparado con controles con EC o con pacientes sin patología EC que consultaban por epigastralgia. Sus resultados indican que la EEO no parece ser parte de la EC. Concluyen que los pacientes con EC y EEO concomitante tienen características de ambas entidades, sin que cada una afecte a la presentación ni al curso clínico de la otra y por tanto proponen que ambas enfermedades sean consideradas y evaluadas por separado ⁽¹⁶⁶⁾. Una revisión sistemática y un metaanálisis recientes sobre esta misma asociación llegan a similares conclusiones ^(164, 167).

II. HIPÓTESIS

La esofagitis eosinofílica es un desorden inmunológico crónico de base alérgica. La tolerancia oral está alterada en las patologías alérgicas. Una gran parte de los mecanismos de regulación de la tolerancia oral asientan en la mucosa intestinal donde los linfocitos intraepiteliales juegan un papel decisivo. El aumento de los linfocitos intraepiteliales en la enteropatía alérgica se ha descrito mediante técnicas inmunohistoquímicas, aunque de forma diferente al patrón característico del LIE en la enfermedad celíaca. Los linfocitos intraepiteliales intestinales podrían estar implicados en la patogenia de la esofagitis eosinofílica.

III. OBJETIVOS

1. OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar el inmunofenotipo de los LIEs de una muestra de pacientes pediátricos con EEO mediante citometría de flujo.

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Describir las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con EC y con EEO.
2. Comparar el linfograma LIE de los pacientes celíacos con el de los pacientes con EEO.
3. Analizar si las variables epidemiológicas y clínicas modifican el linfograma intraepitelial de los pacientes con EEO.
4. Estudiar si los tratamientos dietéticos y/o farmacológicos modifican el linfograma LIE en los enfermos con enfermedad celíaca y/o EEO.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de estudio, prospectivo y observacional, realizado en pacientes de la Sección de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica y aprobado por el Comité de ética e investigaciones clínicas del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid.

1. Población de estudio

La población principal de estudio eran pacientes con EEO confirmada. Se incluyó una muestra pequeña de pacientes con EC para validar la técnica de citometría de flujo, comparando los resultados con lo descrito en la bibliografía para dicha población. Se han utilizado como valores de normalidad de dicha técnica los referidos en la bibliografía. Tanto los EC cuyo patrón LIE está bien caracterizado como lo referido en población no celiaca han servido como grupo control.

Criterios de inclusión:

1. Edad <18 años.
2. Pacientes con sospecha de enteropatía celíaca, que precisaron endoscopia para la confirmación diagnóstica según las últimas recomendaciones de la ESPGHAN 2012 ⁽¹³⁶⁾.
3. Pacientes con enteropatía celíaca que presentaron mala evolución clínica a pesar de la dieta sin gluten.
4. Paciente con sospecha de esofagitis eosinofílica, posteriormente confirmada.

5. Paciente con esofagitis eosinofílica que precisó seguimiento endoscópico.

Criterios de exclusión relativos.

1. Ingesta de AINEs en las 2 semanas previas a la endoscopia.

Criterios de exclusión absolutos:

5. Pacientes con infección por *Giardia lamblia* o *Cryptosporidium* no erradicadas en el momento de la endoscopia.

2. Reclutamiento de pacientes y obtención de muestras

1. Las historias clínicas de los pacientes citados para una endoscopia digestiva alta en la Unidad de pruebas funcionales del Hospital Niño Jesús se revisaron y aquellos pacientes que cumplían los criterios de inclusión y no los de exclusión fueron seleccionados.
2. Todos los pacientes recibieron la hoja de información sobre el estudio y el consentimiento informado.
3. Durante la realización de la prueba y dentro del proceso asistencial se tomaron 2 biopsias de intestino proximal (bulbo y duodeno) del total que se extrae para su estudio rutinario, y se enviaron en medio de cultivo de linfocitos (ver descripción de técnica) al servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.
4. Las muestras se analizaron en las siguientes 12-24 h a su recepción realizando estudio del LIE por citometría de flujo según el protocolo que se describe más adelante.

7. Se han utilizado como valores de normalidad del LIE duodenal los referidos en la bibliografía ⁽¹⁴⁾, por lo que no fue necesario un grupo control.

3. Técnica de citometría de flujo para el estudio del LIE

El estudio del LIE duodenal es la técnica central de esta tesis. Para su realización, contamos con la colaboración del laboratorio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal, donde la Dra. Garbiñe Roy es la responsable de la ejecución y valoración última de los resultados del estudio del LIE de mucosa intestinal por citometría de flujo. La determinación inmunofenotípica por citometría de flujo de los LIEs es una prueba rápida y económica que precisa, como único requisito previo, individualizar las células del epitelio. Ello se consigue fácilmente mediante incubación con agentes quelantes del calcio (EDTA) y reductores (DTT) que rompen las uniones intercelulares del epitelio intestinal sin afectar a la celularidad de la lámina propia. De esta forma se consigue que los LIEs queden en suspensión y sean accesibles al estudio por citometría de flujo; la selección de los mismos por la expresión del antígeno panleucocitario CD45 permite su análisis selectivo impidiendo la contaminación por células epiteliales.

a) Desepitelización de biopsias duodenales

Los fragmentos de biopsia duodenal se incuban durante 1 hora en medio completo (MC) en presencia de ditioneitol (DTT) 1mM y etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM, en agitación mecánica moderada a temperatura ambiente (TA). El MC consta de medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF), 2 mM glutamina, 50 µg/ml gentamicina y 50 µg/ml ampicilina. El proceso debe realizarse inmediatamente tras la extracción para evitar la desepitelización espontánea de la mucosa. Tras

la incubación, se recoge el sobrenadante, descartando el fragmento de mucosa restante. Dicho sobrenadante se centrifuga a 1.200 rpm durante 7 minutos, y la muestra centrifugada se decanta, resuspendiendo el botón celular en MC.

b) Marcajes de membrana

La suspensión celular compuesta por linfocitos y enterocitos obtenidos como anteriormente se ha referido a partir de biopsias, se marca con combinaciones de anticuerpos monoclonales (AcMo) purificados y conjugados con fluorocromos (isotiocianato de fluoresceína/FITC, ficoeritrina/PE, peridínil clorofila/Per-CP, alofococianina/APC) específicos para los antígenos a detectar y a las concentraciones recomendadas por los fabricantes.

Los marcajes se realizan durante 30 minutos a 4°C en MC, siendo las células lavadas con solución salina fisiológica a 1.200 rpm durante 7 minutos, antes de su análisis en un citómetro de flujo. Se analizan entre 2.000 y 5.000 linfocitos por cada combinación de marcadores. Se utilizan anticuerpos conjugados de especificidad irrelevante y de los mismos isotipos de los anticuerpos específicos, para establecer los límites de la fluorescencia inespecífica.

El punto de corte citométrico para la recogida de los datos (umbral, threshold) se basa en la exclusión de los eventos de tamaño (equivalente en citometría al FSC o forward scatter) inferior a un linfocito, para excluir eritrocitos y restos celulares. Los linfocitos, tanto intraepiteliales como de lámina propia, se diferencian de los enterocitos y del resto de células que forman parte de la mucosa, por su baja complejidad interna, que es determinada en citometría por el SSC o side scatter y por la expresión del antígeno panleucocitario CD45.

Estas características permiten realizar una ventana de análisis sobre los leucocitos y sobre ella se determina la expresión del resto de marcadores.

Es esencial que cada laboratorio fije los parámetros citométricos de adquisición de datos, ajustándolos a una sensibilidad y especificidad óptimas, referidas al diagnóstico clínico de certeza.

c) Procesamiento estandarizado

Para procesar las muestras no se requiere esterilidad, pero se realiza en campana la primera parte por el medio y por evitar suciedad en los reactivos.

1. Se marca un tubo de 25 ml tapón blanco.
2. CAMPANA: En el tubo se incluye:
 - 10 ml Medio completo
 - 100 ml EDTA 0.1M (Quelante del Calcio que rompe las uniones celulares dependientes de éste)
 - 100 ml DTT 0.1M (Reductor que rompe las uniones celulares)
 - Biopsia (se recoge la muestra con pipeta Pasteur no-estéril)

Se cierra el tubo y se tapa con parafilm.

3. Se coloca 1h en rotor rueda circular a TA.
4. Se agita brevemente antes de centrifugar; se comprueba que cae la biopsia al fondo (lo que queda es la lámina propia intestinal).
5. Se recoge el sobrenadante teniendo cuidado de no llevarse la lámina propia, con Pasteur no-estéril y se echa en tubo de 10 ml, tapón rojo,

fondo cónica, previamente marcado. Se reserva el tubo blanco por si hay que recuperar la lámina propia.

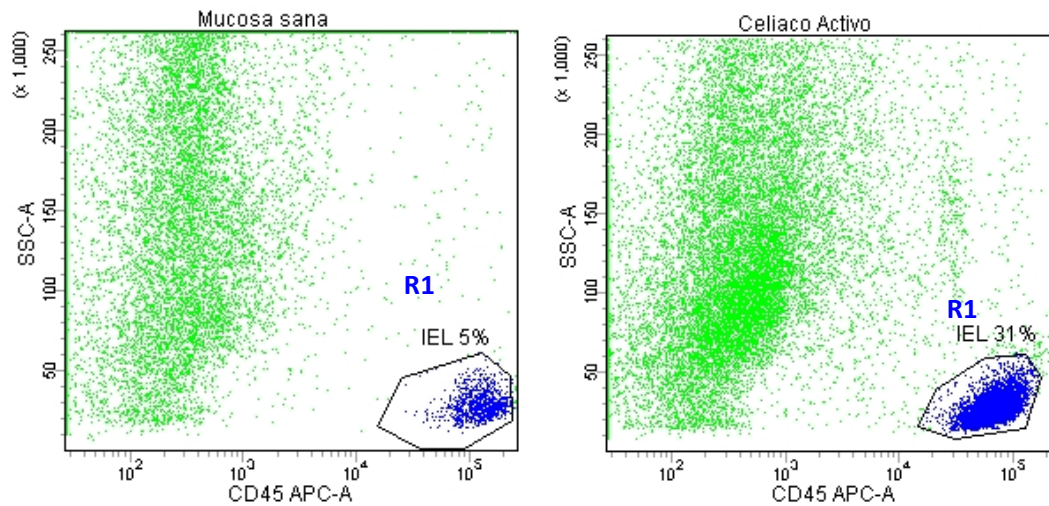
6. Se centrifuga a 1800 rpm, 10 min.
7. Se Decanta y retira con Pasteur no-estéril todo el líquido (el DTT es tóxico para las células).
8. Se resuspende en 300-500 ml MC (así nos aseguramos una cantidad residual de células por si hay que repetir el marcaje).
9. Se cogen 100 ml en tubo de citómetro previamente marcado.
10. Marcaje con anticuerpos monoclonales (usamos Beckton Dickinson):
 - 10 ml CD103 FITC (# 550259 BD)
 - 10 ml TCRgd PE (# 333141 BD)
 - 7 ml CD3 PerCP (# 345766 BD)
 - 5 ml CD45 APC (# 340910 BD)
11. Se incuba 30 min (nunca menos de 15 min) a 4°C en oscuridad.
12. Se lava con 3 ml de SSF, centrifugando a 1400 rpm, 7 min.
13. Se decanta y resuspende en 300 ml SSF. Se adquiere.

d) Análisis en citómetro de flujo

R1: Células CD45⁺: LIEs (IEL: intraepithelial cells).

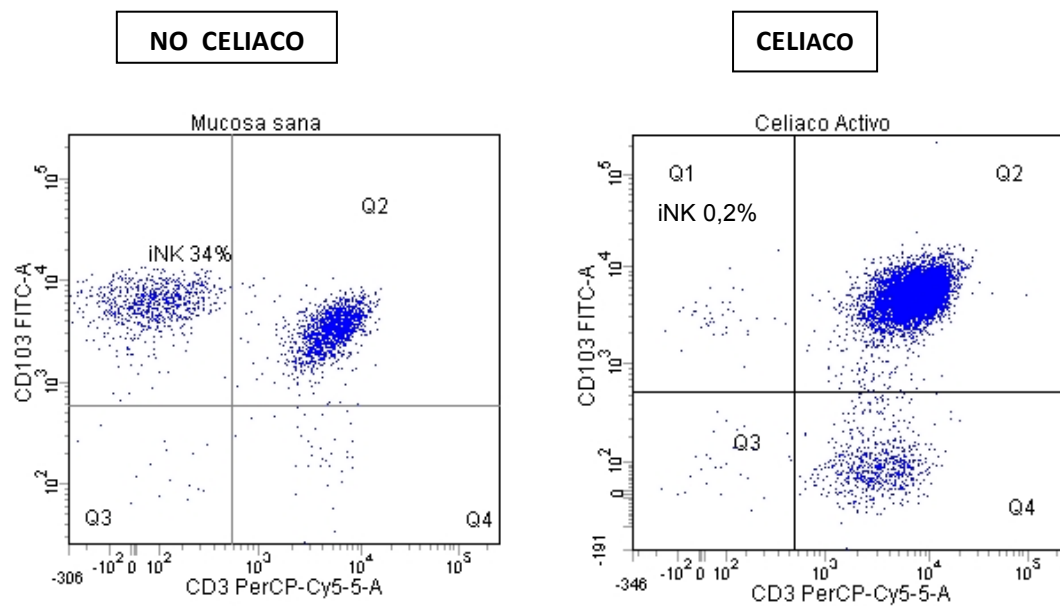
Valores normales: <12% con respecto al total de células del epitelio;

>12% = infiltración de la mucosa (actividad de la enfermedad).

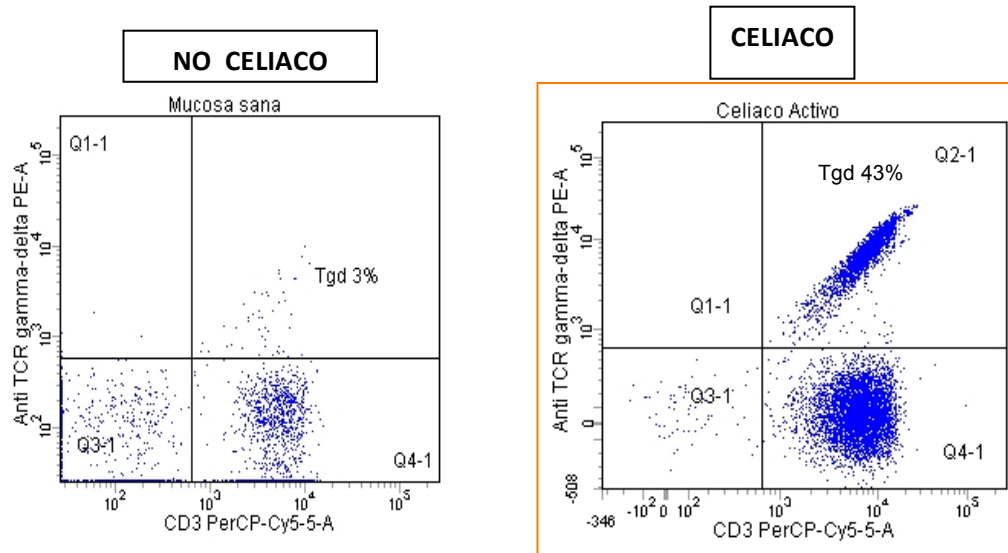


Sobre R1 se hacen 2 dot-plot:

- $CD103^+CD3^-$ i-NK: valor normal = >20%.



- $CD3^+TCRgd$: se mira su valor:
 - respecto al total de LIEs (total de R1): valor normal < 10%.
 - respecto al total de CEI: valor normal < 1%.



Diagnóstico de enteropatía celíaca:

- **Enteropatía celíaca no activa:**

- CD45⁺: <12% (normales).
- CD3⁺TCR $\gamma\delta$ muy aumentados (>10%)
- CD103⁺CD3⁻ muy disminuidos (<20%)

- **Enfermedad celíaca activa:**

- CD45⁺: >12% (mucosa infiltrada).
- CD3⁺TCR $\gamma\delta$ muy aumentados (>10%)
- CD103⁺CD3⁻ muy disminuidos (<20%)

4. Variables epidemiológicas, clínicas y del LIE duodenal

- Número de identificación como participante en el estudio (ID).
- Iniciales de nombre y apellidos del paciente.
- Fecha de nacimiento.
- Fecha de 1ª consulta.
- Fecha de la EDA.
- Antecedentes familiares de atopia.
- Antecedentes familiares de celiaquía.
- Síntomas: vómitos/RGE, dolor abdominal, distensión abdominal, flatulencia, estreñimiento, diarrea, hiporexia, pérdida de peso/estancamiento ponderal, trastorno de la conducta alimentaria, pirosis, disfagia.
- Diagnóstico: enteropatía celiaca , esofagitis eosinofílica.
- Datos analíticos: anemia ferropénica, serología de enfermedad celíaca (antiTG IgA, antiendomiso, anticuerpos antipéptidos deamidados de gliadina IgG), HLA-DQ, IgE total, IgE específicos a alimentos: se considera positiva IgE específica $\geq 0,35$), Test cutáneo (prick test: un diámetro de la pápula de ≥ 3 milímetros sobre el control negativo está asociado a enfermedad alérgica).
- Sexo: hombre, mujer.
- Talla (cm).
- Peso (Kg).
- IMC (valor absoluto).

- Alimentación: dieta libre o alimento excluido de la dieta antes de la endoscopia (leche de vaca, trigo, gluten, huevo, soja/legumbres, otros: frutos secos, pescados, frutas).
- Toma de medicación antes de la endoscopia (IBP/corticoides deglutidos o sistémicos).
- Resultado del estudio endoscópico: signos de esofagitis eosinofílica (sí/no), signos de gastritis (sí/no)
- Resultado/s del estudio histológico: conteo eosinófilos (total; $\geq 15/\text{CGA}$: sí/no), gastritis (sí/no), presencia de *Helicobacter pylori* (sí/no)
- Resultado del linfograma LIE en bulbo y duodeno
 - LIEs totales respecto de CEI: porcentaje y patológico $\geq 12\%$ (sí /no)
 - LT gd respecto de LIEs porcentaje y patológico $\geq 10\%$ (sí /no)
 - LTgd respecto del epitelio porcentaje y patológico $\geq 1\%$ (sí /no)
 - iNK respecto de LIEs porcentaje y patológico $\leq 20\%$ (sí /no)
- Infección por *H.pylori* confirmado en el estudio histológico y/o por cultivo de las biopsias gástricas (sí/no).
- Parásitos en heces: presencia en alguna de las 3 muestras de heces recogidas en 3 días consecutivos antes de la EDA (sí/no).

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha utilizado el programa informático STATA para la realización de los análisis estadísticos. Las variables categóricas se describen mediante porcentajes y las variables continuas mediante la media (desviación estándar) o mediana (rango) según proceda. La asociación entre variables categóricas se evalúa mediante la X^2 (aplicando la corrección de Fisher cuando sea necesario), mientras que la relación entre variables continuas se analiza mediante la t de Student o U de Mann-Whitney para variables paramétricas y no paramétricas respectivamente. Los valores de $p < 0,05$ son considerados como estadísticamente significativos. Se utilizan curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para determinar el punto de corte de la escala de variables cuantitativas continuas en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta. Se estima el área bajo la curva ROC (AUC, *area under the curve*) en estos casos.

VI. RESULTADOS

1. Descripción epidemiológica de la población de estudio

Se ha realizado un estudio prospectivo con 45 pacientes de los que 37 (82,2%) tuvieron un diagnóstico principal de esofagitis eosinofílica (EEo) y 8 (17,8%) de enfermedad celiaca (EC). Inicialmente se incluyeron 4 pacientes con un diagnóstico doble de EEo + EC, que se excluyeron del estudio porque el doble diagnóstico sería un factor de confusión para el análisis del LIE. Como grupo control se utilizaron los resultados publicados del linfograma intraepitelial (LIE) duodenal de pacientes sanos. El grupo de EEo se subdividió según el número de eosinófilos en mucosa esofágica: EEo activa (≥ 15 eos/CGA) y EEo no activa (< 15 eos/CGA). El número de eos/CGA de los pacientes con EEo fue de (media \pm ds) $26,9 \pm 22$ (0-89). Se registraron 26/37 (70,3%) pacientes que cumplían el criterio histológico EEo activa. Sólo 11 (29,7%) estaban en período de remisión de la infiltración eosinofílica esofágica.

Ninguno de los pacientes con EC incluidos en el estudio presentó infiltración esofágica eosinofílica.

La muestra estuvo formada por 32 varones (55,8%) y 13 mujeres (44,2%) que se distribuyeron entre los diagnósticos de la siguiente manera:

Tabla 1. Distribución por género en EEo vs EC

Género	EEo		EC		n	%
	n	%	n	%		
Niños	31	83,8%	1	12,5%	32	71,1%
Niñas	6	16,2%	7	87,5%	13	28,9%
Total	37	100,0%	8	100,0%	45	100,0%

Prueba exacta de Fisher $p < 0,001$

Se encontró que la frecuencia de niños con EEO era 5,17 veces mayor que en niñas y la de niñas con EC era 7 veces mayor que en niños ($p < 0,001$). Al dividir los pacientes con EEO en activa vs no activa no se encontraron diferencias por género ($p=0,335$).

La edad media de los niños cuando se realizó la endoscopia digestiva fue de 10,1 años (entre 2,2 y 17,3 años). Por grupos de edad, 19 (51,4%) niños eran >10 años, 15 (40,5%) tenían entre 5 y 10 años y 3 (8,1%) eran < 3 años. En nuestra muestra, no se encontraron diferencias significativas de edad entre los pacientes con EEO y los EC ($p=0,938$) (Tabla 2). Tampoco se encontraron diferencias significativas por edades al dividir a la población EEO en activa vs no activa ($10,4 \pm 3,5$ vs $9,5 \pm 4,1$ respectivamente, $p=0,518$).

Tabla 2. Edad en pacientes EEO vs EC

Grupo	n	Media	DT	Min	Max	Mdn
EEO	37	10,13	3,65	2,88	16,47	10,28
EC	8	10,01	4,91	2,20	17,30	11,18
Total	45	10,11	3,84	2,20	17,30	10,89

T-test para varianzas iguales $p = 0,9383$.

La frecuencia de pacientes con otros diagnósticos fue de 1 paciente (2,7%) en el grupo EEO (Hernia de Morgagni resuelta) y 2 pacientes (25%) en el grupo EC (Diabetes mellitus tipo I y trastorno de conducta alimentaria). Todas eran niñas. El peso y la talla de los pacientes en ambos grupos (EEO vs EC) fueron muy similares, no encontrándose diferencias significativas entre ellos con $p=0,74$ y $p=0,80$ respectivamente.

El IMC tampoco difirió significativamente en ambas poblaciones (Tabla 3).

Tabla 3. IMC en pacientes EEO vs EC

Grupo	n	Media	DT	Min	Max	Mdn
EEO	36	18,20	3,24	13,43	27,3	17,56
EC	8	17,1	3,38	12,8	22,7	16,06
Total	44	17,4	3,2	11,4	27,3	17,29

T-test para varianzas iguales; $p = 0,3825$.

En los pacientes con EEO se estudió si el IMC se afectaba según estuviese activa o no la enfermedad, no encontrándose diferencias significativas ($17,9 \pm 3,4$ vs $18,7 \pm 2,8$ respectivamente, $p = 0,532$)

2. Antecedentes familiares y personales de atopía

El 91,9% (34/37) de los pacientes con EEO presentaban antecedentes personales de enfermedad atópica, con diferencias significativas respecto a los pacientes celíacos para el asma (44,4% vs 0,0% respectivamente, $p = 0,04$) y para alergia a alimentos IgE mediada (67,5% vs 0,0% respectivamente, $p < 0,001$). Tabla 4.

Tabla 4. AF y AP en pacientes con EEO vs EC

Variable	EEO(n=37)		EC(n=8)		Total(n=44)		p
	n	%	n	%	n	%	
AF asma ^A	8	22,2%	0	0,00%	8	18,18%	0,310
AF derm. atópica ^A	5	13,9%	2	25,00%	7	15,90%	0,590
AF rinoconjuntivitis ^A	20	55,5%	2	25,00%	22	50,00%	0,240
AF alergia alimentos ^A	9	25,0%	0	0,00%	9	20,45%	0,170
AP asma	17	44,4%	0	0,00%	16	36,36%	0,040
AP derm. atópica	20	55,5%	2	25,00%	22	50,00%	0,240
AP rinoconjuntivitis	16	44,4%	1	12,50%	17	38,64%	0,120
AP alergia alimentos	25	67,5%	0	0,00%	25	55,56%	<0,001

^A EEO 36; EC 8

El 75% (27/36) de los pacientes con EEO presentaban antecedentes familiares de enfermedad atópica. Aunque la frecuencia de antecedentes familiares de atopia en los pacientes con EEO fue mayor que en los celíacos, las diferencias no fueron significativas (Tabla 4).

En los pacientes con EEO se estudió si los AP y AF de atopia se asociaban a actividad de la enfermedad. Se encontró que los pacientes con AP de dermatitis atópica (DA) (n=20; 55,6%) tenían con más frecuencia EEO activa ($p=0,034$) (Tabla 5). No hubo diferencias significativas para el resto de antecedentes familiares y personales de manera separada (para asma, rinoconjuntivitis, dermatitis atópica o alergia a alimentos, $p>0,05$) ni cuando se agruparon en pacientes con atopia vs no atopia ($p=1,00$).

Tabla 5. AP de dermatitis atópica en EEO activa vs EEO no activa

	EEO no activa (n=11)		EEO activa (n=25)			
	n	%	n	%	n	%
AP de DA						
No	8	72,7%	8	32,0%	16	44,4%
Sí	3	27,3%	17	68,0%	20	55,6%
Total	11	100,0%	8	100,0%	45	100,0%

Prueba exacta de Fisher, $p=0,034$

3. Clínica

No se encontraron diferencias significativas en los síntomas entre EEO y EC (Tabla 6).

Tabla 6. Síntomas en EEO vs EC

Variable	EEO(n=37)		EC (n=8)		total		P*
	n	%	n	%	n	%	
Vómitos/RGE	16	43,24%	1	12,50%	17	37,78%	0,132
Distensión abdominal	3	8,33%	1	12,50%	4	9,09%	0,566
Dolor abdominal	20	55,56%	5	62,50%	25	56,82%	1
Flatulencia	1	2,78%	1	12,50%	2	4,55%	0,334
Estreñimiento	4	10,81%	0	0%	4	8,89%	1
Diarrea	6	16,22%	0	0%	6	13,33%	0,572
Hiporexia	7	19,44%	3	37,50%	10	22,73%	0,35
Pérdida de peso / Estancamiento estatural	12	32,43%	4	50,00%	16	35,56%	0,427
TCA	4	11,11%	1	12,50%	5	11,36%	1
Pirosis	6	16,67%	0	0,0%	6	13,64%	0,573
Disfagia	19	52,78%	1	12,50%	20	45,45%	0,054

*Prueba exacta de Fisher

Los síntomas que presentan los pacientes afectados de EEO se dan con distinta frecuencia en función de la edad, como se ha referido en la introducción. Por este motivo se estratificó la clínica por edad en este grupo (Tablas 7). Se encontró que la distensión abdominal no era una característica clínica de los pacientes con EEO >10 años, ya que ningún paciente la presentaba, aunque la diferencia con los otros grupos etarios no alcanzó significación estadística ($p=0,052$). Así mismo este análisis corroboró que la disfagia es más frecuente en los niños mayores, aunque se vio que los niños con EEO <5 años también la presentan. La diferencia entre los 3 grupos alcanzó significación estadística ($p<0,001$). En EC no se encontraron diferencias en los mismos síntomas por grupos etarios ($p>0,05$).

Tabla 7. Síntomas en EEO según edad.

Variable	EEO (0-5 años)		EEO (5-10 años)		EEO (>10 años)		p*
	n=3	%	n=15	%	n=19	%	
Vómitos /RGE	1	33,3%	9	60%	6	31,6	0,250
Distensión abdominal	1	33,3%	2	13,3%	0	0,0%	0,052
Dolor abdominal	3	100%	7	46,6%	10	52,6%	0,402
Flatulencia	0	0,0%	1	6,7%	0	0,0%	0,472
Estreñimiento	0	0,0%	1	6,7%	3	15,8%	0,728
Diarrea	1	33,3%	1	6,7%	4	21,1%	0,303
Hiporexia	1	33,3%	3	20,0%	3	15,8%	0,831
Pérdida de peso / Estancamiento estatural	1	33,3%	8	53,3%	3	15,8%	0,065
TCA	0	0,0%	3	20,0%	1	5,3%	0,384
Pirosis	0	0,0%	2	13,3%	4	21,1%	1,000
Disfagia	2	20,0%	2	13,3%	15	79,0%	<0,001

*Prueba exacta de Fisher

En los pacientes con EEO se estudió también si los signos y síntomas se asociaban a actividad de la enfermedad. Se evidenció que los pacientes con EEO no activa presentaban distensión abdominal (n=3; 27,3%) con más frecuencia que los que tenían EEO activa (p= 0,023). No hubo diferencias significativas (p>0,05) para el resto de signos y síntomas (Tabla 8).

Tabla 8. Síntomas en EEO activa vs no activa

Variable	EEO no activa (n=12)		EEO activa (n25)		p*
	n	%	n	%	
Vómitos/RGE	4	36,4%	12	46,1%	0,723
Distensión abdominal	3	27,3%	0	0,0%	0,023
Dolor abdominal	8	72,7%	12	48%	0,277
Flatulencia	1	9,1%	0	0,0%	0,306
Estreñimiento	1	9,1%	3	11,5%	1
Diarrea	3	27,3%	3	11,5%	0,335
Hiporexia	3	27,3%	4	16,0%	0,650
Pérdida de peso / Estancamiento estatural	4	36,4%	8	30,8%	1
TCA	2	18,2%	2	8,0%	0,570
Pirosis	2	18,2%	4	16,0%	1
Disfagia	5	45,5%	14	56%	0,721

*Prueba exacta de Fisher

4. Pruebas complementarias

4.1. Inmunoglobulina A

Los niveles de inmunoglobulina A (mg/dL) estuvieron en rango normal para la edad en todos los pacientes con EC ($139,6 \pm 59,1$) y en 32 de los 34 pacientes con EEO ($116,5 \pm 65,0$) en los que se registró. Se encontraron 2 pacientes con déficit de Ig A: una niña de 4 años y 6 m y un niño de 10 años y 3 meses.

4.2. Pruebas serológicas de enfermedad celiaca

Los ATG2 (U/ml) y los AADG se describen como variables cuantitativas y como variables categorizadas. En nuestro laboratorio los resultados se clasifican según los siguientes intervalos ATG2 IgA: $<3,5$ =negativo; $3,5-7$ =dudoso;

>7:=positivo; AADG>7=positivo. En los pacientes con EEO como todos eran mayores de 2 años sólo se estudiaron los anticuerpos ATG2 IgA. Los anticuerpos referidos son marcadores serológicos útiles en el cribado, diagnóstico y seguimiento de los pacientes celíacos. Habitualmente se realiza estudio serológico también a los pacientes con EEO para descartar enfermedad celíaca. Ninguno de nuestros pacientes EEO presentó niveles elevados de ATG2, por lo que la diferencia con los enfermos celíacos fue significativa ($p<0,001$) (Tabla 9).

Tabla 9. Anticuerpos anti TG2IgA y AADG

Variable	Grupo	n	Media	DT	Min	Max	Mdn
*AntiTG2 IgA	EoE	32	,4	,4	,1	2,3	,3
	EC	8	43,11	66,50	7,70	201,0	13,5
AADG	EC	8	45,2	68,2	,5	200,0	18,1

*T-test para varianzas iguales; $p < 0,001$.

4.3. Pruebas de alergia en pacientes con EEO

Las pruebas de alergia no se realizan de rutina a los pacientes con EC por lo que no se incluyeron en el estudio de esta población. A continuación se consideran las variables numéricas IgE total y específicas a algunos alimentos de los pacientes con EEO (Tabla 10).

Tabla 10. IgE total y específicas a alimentos en pacientes con EEO

Variable	n	Media	DT	Min	Max	Mdn
IgE total	34	466,7	728,5	6,1	3741,0	204,5
IgE PLV	29	12,35	37,86	0,00	174,00	
IgE betalactoglob	24	1,86	4,48	0,00	20,30	,24
IgE alfa lactoalb	18	5,28	10,68	0,00	34,79	,15
IgE huevo	23	16,25	48,73	0,00	223,00	,35
IgE clara	29	9,55	31,01	0,00	161,00	,37
IgE yema	20	2,13	5,42	0,00	22,90	,16
IgE ovomucoide	15	7,41	17,24	0,00	66,50	,36
IgE frutos secos	25	8,31	22,91	0,00	115,00	1,70
IgE pescado	22	6,96	19,84	0,00	73,90	,45
IgE soja	15	1,78	2,51	0,00	8,79	,35
IgE trigo	27	1,98	3,67	0,00	17,00	,50
IgE gluten	20	1,37	3,26	0,00	13,60	,22

En la tabla 11 se exponen los resultados de las mismas variables haciendo referencia al nº y % de pacientes en que se han encontrado patológicas (IgE total alta según intervalo de normalidad para edad e IgE específicas $\geq 0,35$ kU/l). De los pacientes con EEO en los que se valoró la IgE total, 27 (79,4%) la tenían elevada y el mismo número tenía al menos una IgE específica positiva para algún alimento. El grupo de alimentos para el que con más frecuencia se detectó una IgE específica positiva fue el de los frutos secos (72%), en segundo lugar el trigo (69%) y en tercero la clara de huevo (61%). La IgE específica a PLV fue positiva en el 53% de pacientes.

**Tabla 11. IgE total y específicas a alimentos
patológicas en pacientes con EEO**

Variable		EoE(n=37)	
		n	%
IgE ^A	Alto	27	79,4%
IgE PLV ^B	≥0,35	16	53,3%
IgE betalactoglo ^C	≥0,35	11	44,0%
IgE alfa lactoalb ^D	≥0,35	10	38,5%
IgE huevo ^E	≥0,35	15	60,0%
IgE clara ^F	≥0,35	19	61,3%
IgE yema ^G	≥0,35	8	33,3%
IgE ovomucoid ^H	≥0,35	9	60,0%
IgE frutos secos ^I	≥0,35	18	72,0%
IgE pescado ^J	≥0,35	12	50,0%
IgE soja ^K	≥0,35	8	50,0%
IgE trigo ^L	≥0,35	20	69,0%
IgE gluten ^M	≥0,35	8	34,8%
IgE otros ^N	positivo	24	77,4%

Tamaño de muestra. ^A: EoE 34; ^B: EoE 30;
^C: EoE 25; ^D: EoE 26; ^E: EoE 25; ^F: EoE 31;
^G: EoE 24; ^H: EoE 15; ^I: EoE 25; ^J: EoE 24;
^K: EoE 16; ^L: EoE 29; ^M: EoE 23; ^N: EoE 31.

Se analizó si la actividad de la enfermedad se asociaba a niveles altos de IgE total pero no se encontraron diferencias significativas (Tabla 12).

Tabla 12. IgE total en EEO activa vs no activa

	EEO no activa		EEO activa	
	(n=10)		(n=23)	
IgE total	n	%	n	%
Normal	3	50,0%	3	50,0%
Alta	7	25,9%	20	74,1%

Prueba exacta de Fisher p=0,336

Test cutáneo (Prick test)

En algunos pacientes con esofagitis eosinofílica se realizaron test cutáneos en el Servicio de Alergia. El 67,5% ya estaban diagnosticados de alergia alimentaria IgE mediada (25/37) y el test cutáneo formaba parte del diagnóstico y/o seguimiento. En otros se solicitaron test cutáneos tras el diagnóstico de esofagitis eosinofílica (Tabla 13).

Tabla 13. Test cutáneo (Prick) en pacientes EEO

Variable		EEO	
		n	%
Prick LV ^A	positivo	4	21,1%
Prick huevo ^B	positivo	8	34,8%
Prick fr. secos ^C	positivo	10	43,5%
Prick pescado ^D	positivo	6	25,0%
Prick soja ^E	positivo	2	12,5%
Prick trigo ^F	positivo	5	27,8%
Prick gluten ^G	positivo	0	0,0%
Prick otros ^H	positivo	21	77,8%

Tamaño de muestra. ^A: EoE 19; ^B: EoE 23; ^C: EoE 23;

^D: EoE 24; ^E: EoE 16; ^F: EoE 18; ^G: EoE 4; ^H: EoE 28

El grupo de alimentos con reacciones positivas en piel más frecuente en nuestra serie fue el de los frutos secos (43,5%), y consecutivamente frente al huevo (34,8%), seguido del trigo (27,8%) y el pescado (25,0%). A la leche de vaca tuvieron prueba cutánea positiva un 21% de los niños en que se realizó, a pesar de ser el alimento que con mayor frecuencia se ha encontrado como inductor de EEO. El test cutáneo a gluten se realizó en 4 pacientes siendo en todos ellos negativos, a diferencia del test a trigo que se realizó en 18 pacientes con positividad en 5 (27,8%). El grupo "otros" incluía una mezcla heterogénea de cacahuets, otras legumbres, cereales sin gluten, frutas y carnes, de ahí el elevado porcentaje (77,8%) de positividad de la prueba en el conjunto.

4.4. Número de eosinófilos en sangre periférica

Se ha considerado eosinofilia cuando el recuento de eosinófilos en sangre periférica era ≥ 450 eosinófilos / μ L . En nuestros pacientes con EEO, 19 de 34 (55,9%) presentaban eosinofilia (Tabla 14).

Tabla 14. Distribución del n de eosinófilos en sangre periférica en EEO

	n	Media	DT	Min	Max	Mdn
Nº eos sangre EoE	34	600,2941	279,940	150,00	1210	560

Tabla 15. Distribución del nº de eosinófilos en sangre periférica en EEO activa vs no activa

	n	Media	DT	(95% Intervalo Conf)	
Nº eos EEO no activa	9	456,66	176,14	321,27	592,06
Nº eos EEO activa	25	652	294,77	530,32	773,68

T-test para varianzas iguales $p=0,0720$

Se analizó si la actividad de la enfermedad se asociaba a niveles altos de eosinófilos en sangre periférica, pero no se encontraron diferencias

significativas ni en la distribución cuantitativa ni en la variable cualitativa (≥ 450 eos/ μ L (Tablas 15 y 16 respectivamente).

Tabla 16. Eosinófilos en sangre en EEO activa vs no activa

	EEO no activa (n=9)		EEO activa (n=26)	
	n	%	n	%
Eosinófilos sangre periférica				
Normal	5	41,7%	7	58,3%
Altos	4	17,4%	19	82,6%

Prueba exacta de Fisher $p=0,220$

4.5. Resultados EDA e histológico (AP)

4.5.1. Clasificación Marsh

El estudio histológico de las biopsias de bulbo y 2ª porción de duodeno informó del estadio según la clasificación Marsh en todos los pacientes EC y EEO. Ninguno se clasificó como Marsh 2. El número de pacientes en los que la AP no evidenciaba ninguna alteración (Marsh 0) en los pacientes con EEO fue de 32 (86,5%) frente a 2 pacientes con EC (25%), siendo dicha diferencia estadísticamente significativa ($p<0,001$). Se encontró linfocitosis duodenal (Marsh 1: $>25\%$ de LIEs) en 5 (13,5%) vs 3 (37,5%) de los pacientes con EoE y EC respectivamente sin que la diferencia fuese significativa ($p=0,137$). Sólo se describió enteropatía con atrofia vellositaria (Marsh3) en 3 (37,5%) pacientes con EC. Ningún paciente con EoE la presentó ($p=0,004$).

Se estudió si la actividad de la enfermedad se asociaba al estadiaje Marsh, pero no se encontraron diferencias significativas (Tabla 17).

Tabla 17. Estadiaje Marsh en EEO activa vs no activa

Marsh	EEO no activa (n=11)		EEO activa (n=26)		p*
	n	%	n	%	
0	9	81,8%	23	88,5%	0,623
1	2	18,2%	3	11,5%	0,623

*Prueba exacta de Fisher

4.5.2. Signos de gastritis en la EDA

En 36/37 pacientes con EEO se recogió información referente a la presencia de signos sugestivos de gastritis en la EDA. En 17 (47,2%) se objetivó gastritis, por encima del número de pacientes con *Helicobacter pylori*, aislado sólo en 8 (24,2%), todos ellos con signos de gastritis referida sobre todo como gastritis antral nodular. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes EEO y los EC en los que se registraron signos de gastritis en la EDA (47,2% vs 25% respectivamente, $p=0,433$).

Se analizó si los pacientes con EEO con o sin actividad asociaban gastritis reconocida por el endoscopista en la EDA, pero no se encontraron diferencias significativas (40% vs 63%, $p=0,281$).

4.5.3. Signos sugerentes de EEO en la EDA

En 30 (81,0%) pacientes con EEO se objetivaron signos sugerentes de EEO en la EDA (exudados algodonosos, surcos longitudinales marcados, traquealización, estenosis, friabilidad de mucosa). Ningún paciente con EC los presentaba. Se estudió también si en los pacientes con EEO la descripción de los signos de EEO en la EDA se asociaba a la actividad de la enfermedad según la AP, pero no se encontraron diferencias significativas, $p=0,403$ (Tabla

18). Lo que demuestra la escasa concordancia entre los hallazgos macroscópicos y la histología.

Tabla 18. Signos de EEO en EDA en EEO activa vs no activa

	EEO no activa (n=11)		EEO activa (n=26)		p*
	n	%	n	%	
Signos de EEO en EDA					
No	3	27,3%	4	15,4%	0,403
Sí	8	72,7%	22	84,6%	

*Prueba exacta de Fisher

4.5.4. Gastritis en el estudio histológico

La mayoría de los pacientes con EoE y EC presentaban criterios de gastritis crónica en la anatomía patológica: 23 (65,7%) y 5 (71,5%) respectivamente, aunque con actividad sólo 5 (14,3%) y 2 (28,6%) respectivamente (p=0,733).

Se analizó si los pacientes con EEO con o sin actividad asociaban gastritis en el estudio histológico, pero no se encontraron diferencias significativas (p=0,164) (Tabla 19).

Tabla 19. Gastritis estudio histológico en EEO activa vs no activa

	EEO no activa (n=11)		EEO activa (n=24)		p*
	n	%	n	%	
Gastritis crónica AP					
No	3	27,7%	9	37,5%	
Sin actividad inflamatoria	8	72,7%	10	41,7%	0,164
Con actividad inflamatoria	0	0,0%	5	11,5%	

*Prueba exacta de Fisher

4.6. Infección por *Helicobacter pylori* (HP)

Se analizó la presencia de infección por HP en ambos grupos de pacientes. En 4 pacientes con EEO activa no se pudo descartar la presencia de *H. pylori* en el estudio AP (falta de biopsia antral), por lo que no se incluyeron en el análisis. El porcentaje de infección HP en EEO fue 24,2% y en EC 37,5%, sin encontrar diferencias significativas ($p=0,369$) (Tabla 20).

Tabla 20. Infección por *H. Pylori* en EC vs EEO

		EoE (n=33)		EC (8)		total		p*
		n	%	n	%	n	%	
Infección HP	Sí	8	24,2%	3	37,5%	11	26,8%	0,369

*Prueba exacta de Fisher

Se analizó si los pacientes con EEO con o sin actividad se asociaban a infección por HP, pero no se encontraron diferencias significativas ($p=0,687$) (Tabla 21).

Tabla 21. Infección por HP en EEO activa vs no activa

	EEO no activa (n=11)		EEO activa (n=22)		p*
	n	%	n	%	
Infección HP					
No	9	81,8%	16	72,7%	0,687
Sí	2	18,2%	6	27,3%	

*Prueba exacta de Fisher

5. Tratamiento

Los pacientes con EoE pueden recibir tratamiento médico (inhibidores de la bomba de protones (IBP), corticoides deglutidos u orales) y/o dietético (dietas de eliminación de alimentos o grupos de alimentos). En el momento de la EDA,

25 (67,6%) pacientes con EEO seguían algún tipo de dieta. De ellos 15 (40,5%) estaban en tratamiento dietético exclusivo. Los pacientes que seguían tratamiento dietético lo hacían mediante dietas de eliminación de 2-4-6 grupos de alimentos individualizadas por consenso con la familia y el servicio de Alergia, junto con la eliminación de aquellos alimentos a los que presentaban alergia IgE mediada diagnosticada previamente. Ocho pacientes (21,6%) estaban en tratamiento sólo con IBP (esomeprazol y omeprazol). En 10 (24,3%) pacientes el tratamiento combinaba dieta y tratamiento médico, de ellos 9 tenían tratamiento dietético junto con IBP. Por último en frecuencia, 4 pacientes no recibían tratamiento, 3 por ser la primera endoscopia diagnóstica de EoE, y por lo tanto con enfermedad activa y 1 en que la EDA se realizó de control tras normalización de las EDA años antes y reaparición de clínica digestiva, que resultó no estar asociada a actividad de EEO, ya que dicho paciente se encontraba en remisión. Sólo 1 paciente recibía tratamiento corticoideo (Fluticasona MDI) deglutido, combinado con dieta. Ninguno recibía tratamiento corticoideo sistémico (Tabla 22).

Tabla 22. Tratamiento en EEO activa vs no activa

Tipo de tratamiento	EEO(n=37)		EEO no activa (n=11)		EEO activa (n=26)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sin tratamiento	4	10,8%	1	25%	3	75%	
Dieta exclusiva	15	40,5%	0	0,0%	15	100%	
IBP exclusivo	8	21,6%	3	37,5%	5	62,5%	<0,001
*Combinado	10	27,0%	4	40,0%	6	60,0%	

*Combinado: tratamiento con dieta de eliminación de al menos un alimento y tratamiento médico (sólo 1 de los combinados era dieta y corticoide deglutido, que se encontraba sin actividad , el resto dieta/IBP)

El 37,5% (3/8) de los pacientes en tratamiento exclusivo con IBP tenía EEO no activa. De los pacientes en tratamiento dietético exclusivo (15) ninguno estaba en remisión. De los 10 en tratamiento combinado, 4 estaban en remisión. En conjunto el 16% de los pacientes que seguían alguna dieta de exclusión presentaba una EEO no activa. Cada paciente en tratamiento dietético se encontraba en una fase distinta del proceso de eliminación y reintroducción de los alimentos, por lo que las dietas que seguían no eran las definitivas en su tratamiento. La combinación entre los distintos alimentos era muy variada: 1 paciente dieta sin leche y sin soja; 1 sin huevo; 1 sin legumbres, sin "otros"; 1 sin leche, sin gluten, sin huevo, sin "otros"; 1 sin leche, sin huevo, sin legumbres, sin "otros"; 2 sin leche, sin soja, sin "otros"; 2 sin gluten, sin "otros"; 5 sin leche, sin gluten, sin huevo, sin legumbres, sin "otros"; 2 sin leche, sin huevo; 8 sin "otros". En "otros" se incluyeron frutos secos, pescados y frutas, ya que por separado son los alimentos que menos se asocian a EEO según los estudios publicados ⁽⁸⁹⁾. Los alimentos eliminados se recogen en la tabla 23.

Tabla 23. Alimentos eliminados en los pacientes tratados con dieta de forma exclusiva o combinada

Dieta preEDA		EEO(n=37)	
		n	%
Libre	Sí	12	32,4%
Sin gluten	Sí	6	15,8%
Sin leche	Sí	12	31,6%
Sin soja	Sí	8	21,1%
Sin huevo	Sí	11	28,9%
Sin trigo	Sí	8	21,1%
Sin otros	Sí	21	55,3%

De los 8 pacientes con EC, 2 seguían ya una dieta sin gluten antes de la EDA y la prueba se indicó por clínica digestiva (epigastralgia). Los restantes 6 tomaban gluten en cantidades normales, siempre según lo referido por la familia y el propio paciente. No excluían ningún otro alimento.

6. Linfograma intraepitelial duodenal (LIE)

El LIE duodenal en la enfermedad celiaca está ampliamente caracterizado. Los LIEs totales respecto de las células epiteliales están elevados por encima de un 12%. Los linfocitos T $\gamma\delta$ están elevados respecto del total de LIEs $\geq 10\%$ y también respecto de las células epiteliales $\geq 1\%$. Las NK intestinales respecto al total de LIEs están descendidas $< 20\%$. En los pacientes EC que siguen dieta sin gluten los LIEs respecto de las células epiteliales tienden a normalizarse, quedando los LT $\gamma\delta$ elevados y las iNK bajas, aunque en menor medida que cuando siguen una dieta con gluten. Se comprobó que nuestra población de EC se comportaba según lo descrito en la literatura (Tabla 24). Todos los pacientes celiacos tenían alteración de los LT gamma delta y de las iNK en alguna de las porciones del intestino (bulbo y/o 2ª porción de duodeno). Aunque no fue significativa la diferencia, los LIE respecto del total de CEI en bulbo eran normales en los pacientes que ya seguían DSG.

Tabla 24. LIE en pacientes EC en Dieta con gluten vs DSG

	EC Dieta con gluten (n=6)		EC Dieta sin gluten (n=2)		p
	n	%	n	%	
%LIE bulbo $\geq 12\%$	4	66,7%	0	0,0%	0,43
%LIE duodeno $\geq 12^B$	2	33,3%	1	50,0%	1
%LT gd LIE bulbo $\geq 10\%$	5	83,3%	2	100%	1
%LT gdLIE duodeno $\geq 10\%$	6	100%	2	100%	-----
%LT gd LIE epitelio bulbo $\geq 1\%$	5	83,3%	2	100%	1
%LT gdLIE epitelio duodeno $\geq 1\%$	5	83,3%	1	50%	0,46
%iNK LIE bulbo $< 20\%$	6	100%	1	50%	0,25
% iNK LIE duodeno $< 20\%$	6	100%	2	100%	-----

Para validar nuestros resultados era necesario un grupo control. Sin embargo puesto que está disponible en la literatura los valores de LIE duodenal en pacientes no celíacos, se compararon los datos publicados en niños con nuestra población de EC y de EEO ⁽¹⁴⁾. Los resultados de dicho análisis se reflejan en las tablas 25 y 26.

Tabla 25. Comparación de LIE duodenal en EC vs pacientes no EC ni EEO en la bibliografía

	Niños no EC*			EC			Diferencia de medias		p
	n	Media	IC _{95%}	n	Media	IC _{95%}	Media	IC _{95%}	
LIE Duod	72	7.66	[6.96-8.36]	8	10.29	[5.06 - 15.52]	-2.63	[-5.15 - -0.11]	0.278
LT_gd_LIE_Duod	74	6.86	[5.78-7.93]	8	30.14	[20.00 - 0.27]	-23.28	[-33.49 - -13.07]	0.001
ink_LIE_Duod (<3a)	36	50.23	[45.01-55.45]	1	1.90	-	-	-	-
ink_LIE_Duod (>3a)	35	28.28	[23.74 - 32.82]	7	7.09	[0.671 - 3.50]	21.19	[10.75-31.63]	<0.001

Tabla 26. Comparación del LIE duodenal de EEO vs pacientes no EEO ni EC en la bibliografía

	Niños no EC*			EEO			Diferencia de medias		p
	n	Media	IC _{95%}	n	Media	IC _{95%}	Media	IC _{95%}	
LIE_Duod	72	7.66	[6.96-8.36]	36	7.78	[6.57 - 8.99]	-0.12	[-1.42 - 1.18]	0.855
LT_gd_LIE_Duod	74	6.86	(5.78-7.93]	36	7.12	[5.46 - 8.77]	-0.26	[-2.17 -1.65]	0.788
ink_LIE_Duod (<3a)	36	50.23	[45.01-55.45]	1	22.20	-	-	-	-
ink_LIE_Duod (>3a)	35	28.28	[23.74 - 32.82]	35	25.03	[20.85 - 9.18]	3,25	[-2.79 - 9.29]	0.287

Los pacientes celíacos presentaron valores del LIE significativamente diferentes que los publicados para pacientes no celíacos, excepto para los LIEs totales respecto de las CEI. Esto podría deberse en parte a la reducida muestra y a que 2 de los 8 pacientes EC se encontraban en tratamiento con dieta sin gluten, que como ya se ha descrito, normaliza este compartimento del LIE duodenal.

Los pacientes con EEO no muestran diferencias en el LIE duodenal con la población de referencia.

Con los análisis previos se validan los resultados de nuestro estudio del LIE duodenal en enfermos celíacos.

A continuación nos planteamos si la actividad de la EEO a nivel local esofágico marcada por el nº de eosinófilos en esófago $\geq 15/\text{CGA}$, se asociaba a alteración en el LIE duodenal. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas, aunque como se evidencia en la tabla 27, no registramos ningún paciente con el porcentaje de LIEs respecto del total de CEI en duodeno alterado en pacientes EEO sin actividad (0,0% vs 24,0%, $p=0,148$).

Tabla 27. LIE en pacientes con EEO activa vs no activa

		<i>EoE no activa (nº eos<15/CGA)</i>		<i>EoE activa (nº eos≥15/CGA)</i>		
Variable	Categoria	%	n	%	n	p*
LIE						
Bulbo ^A	≥12	9,1	1	12,5	4	1
Duod ^B	≥12	0,0	0	24,0	6	0,148
LT gd de LIE						
Bulbo ^A	≥10	18,2	2	20,8	7	1
Duod ^B	≥10	27,3	3	20,0	8	0,678
LTgd de Epitelio						
Bulbo ^A	≥1	9,1	1	12,5	4	1
Duod ^B	≥1	9,1	1	24,0	7	0,4
iNK de LIE						
Bulbo ^A	≤20	45,5	5	58,3	19	0,716
Duod ^B	≤20	18,2	2	36,0	11	0,439

Tamaño de muestra. ^A: EEO no activa: 11; EEO activa en bulbo 24; ^B: EEO no activa: 11; EEO activa en duodeno 25.

Puesto que no se encontraron diferencias significativas entre EEO activa y no activa, el resto de los análisis referidos al LIE se realizaron en el total de pacientes con EEO.

A continuación se comparó el LIE de EC y EEO. Los EC presentaban un patrón claramente diferenciado de los EEO, con incremento de LIEs, LTgd y disminución de iNK, con significación estadística según los valores reflejados en las tablas 28 y 29. Sin embargo, la diferencia en las alteraciones encontradas en el % LIEs totales respecto de las CEI en duodeno en ambos grupos no alcanzó significación estadística (Figuras 7 y 8).

Tabla 28. Descripción cuantitativa del LIE duodenal en pacientes EoE vs EC

	Grupo	n	Media	DT	Min	Max	Mdn	p
%LIEs del total CEI bulbo	EEO	35	7,15	3,87	1,30	19,60	6,20	0,019
	EC	8	13,22	8,14	1,30	29,40	11,70	
%LIE del total CEI duodeno	EEO	36	7,78	3,60	3,20	17,80	6,50	0,353
	EC	8	11,39	6,72	3,00	20,20	11,80	
%LT gd de LIE bulbo	EEO	35	6,78	4,67	1,40	21,40	5,90	<0,001
	EC	8	27,74	13,04	8,40	52,30	25,50	
%LT gd de LIE duodeno	EEO	36	7,12	4,93	1,10	22,80	6,10	0,002
	EC	8	28,80	12,03	16,00	45,00	24,30	
%LT gd de epitelio bulbo	EEO	35	0,46	0,38	0,10	1,50	0,30	<0,001
	EC	8	3,68	3,00	,30	8,20	2,20	
%LT gd epitelio duodeno	EEO	36	0,53	0,46	0,10	2,10	0,30	<0,001
	EC	8	5,63	7,76	,50	25,20	3,00	
%iNK de LIE bulbo	EEO	35	22,25	12,05	5,20	48,20	18,90	0,058
	EC	8	11,21	13,12	,20	37,60	2,70	
%iNK de LIE duodeno	EEO	36	24,95	11,94	10,10	68,00	23,45	<0,001
	EC	8	9,12	10,32	0,60	30,60	3,10	

Tabla 29. LIE duodenal patológico en EC vs EEO

Variable	Categoria	EC (n=8)		EEo (n=37)		p*
		%	n	%	n	
%LIEs del total CEI						
Bulbo	≥12	50,00	4	11,43	4 ^A	0,028
Duod	≥12	37,50	3	16,67	6 ^B	0,329
%LT gd de LIEs						
Bulbo	≥10	87,50	7	20,00	7 ^A	0,001
Duod	≥10	100,00	8	22,22	8 ^B	0,000
%LT gd de epitelio_						
Bulbo	≥1	87,50	7	11,43	4 ^A	0,000
Duod	≥1	75,00	6	19,44	7 ^B	0,005
%iNK de LIEs						
Bulbo	≤20	87,50	7	54,29	19 ^A	0,119
Duod	≤20	100,00	8	30.56	11 ^B	0,000

Tamaño de muestra. ^A: EEO 35; ^B: EEO 36

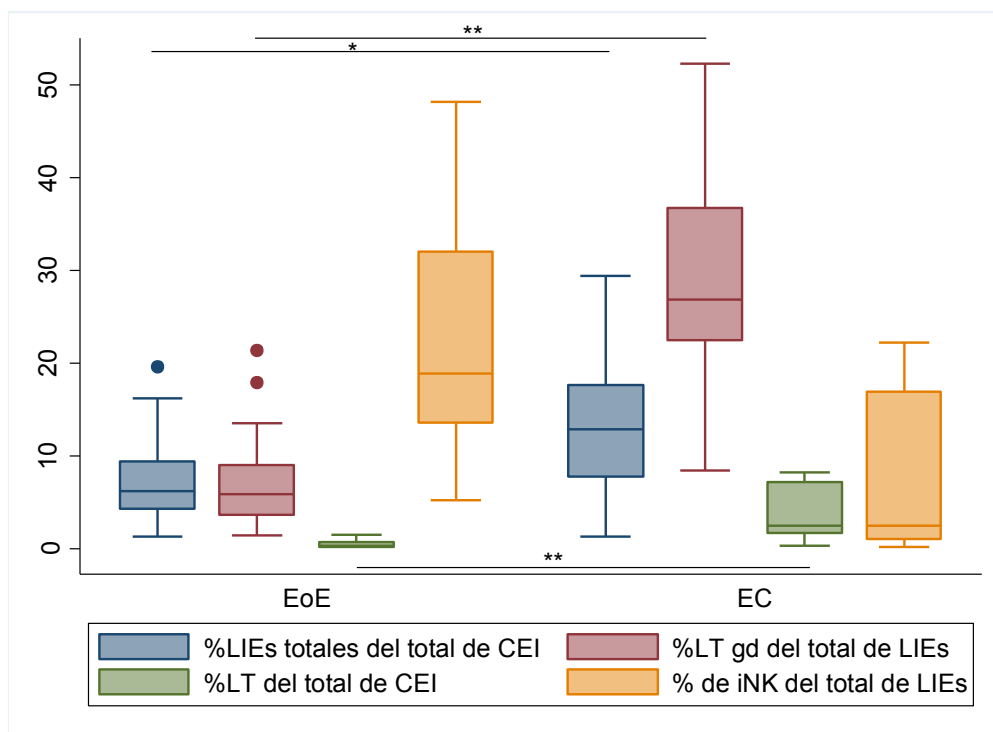


Figura 7. Fenotipo de los linfocitos intraepiteliales en el bulbo duodenal de los pacientes con esofagitis eosinofílica y con enfermedad celiaca. *p<0,05; **p<0.001

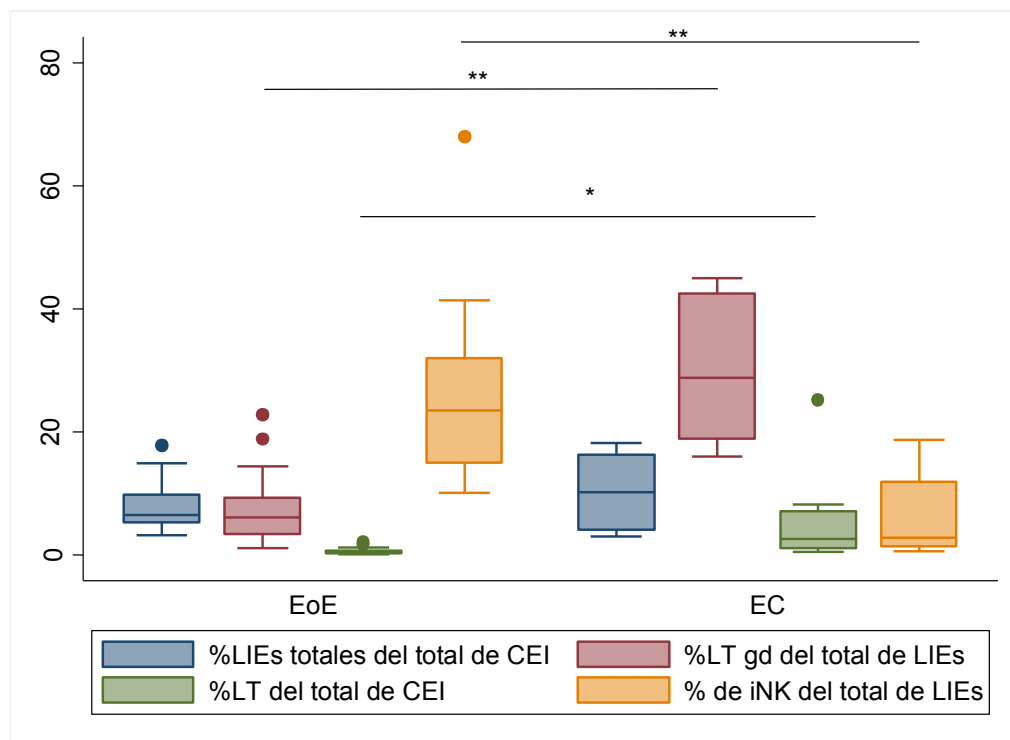


Figura 8. Fenotipo de los linfocitos intraepiteliales en el duodeno de los pacientes con esofagitis eosinofílica y con enfermedad celiaca. *p<0,05; ** p≤0.001

Dado que la dieta sin gluten normaliza la expresión de los LIEs respecto del total de CEI en los celíacos, el análisis por separado de ambos grupos segregados entre dieta sin o con gluten debería diferenciar ambas poblaciones (EC vs EEO). Sin embargo, aún tomando gluten, tanto los pacientes celíacos como los EEO tienden a presentar los LIES en duodeno alterados sin diferencias significativas (Tablas 30 y 31).

Tabla 30. LIE duodenal patológico en EC vs EEO con dieta sin gluten

Variable	Categoria	EC (n=2)		EEo(n=6)		p*
		%	n	%	n	
%LIE de CEI						
Bulbo	≥12	0.00	0	20.00	1**	1
Duod	≥12	50.00	1	16,67	1	0,464
%LT gd de LIE						
Bulbo	≥10	100.00	2	40.00	2**	0,429
Duod	≥10	100.00	2	50.00	3	0,464
%LT gd de epitelio						
Bulbo	≥1	100.00	2	20.00	1**	0,143
Duod	≥1	50.00	1	33,33	2	1
%iNK de LIE						
Bulbo	≤20	50.00	1	60.00	3**	1
Duod	≤20	100.00	2	33,33	2	0,429

Tabla 31. LIE duodenal patológico en EC vs EEO con dieta con gluten

Variable	Categoría	EC (n=6)		EEo (n=30)		p*
		%	n	%	n	
%LIE de CEI						
Bulbo	≥12	66,67	4	10.00	3	0,008
Duod	≥12	33,33	2	16,67	5	0,573
%LTgd de LIE						
Bulbo	≥10	83,33	5	16,67	5	0,003
Duod	≥10	100.00	6	16,67	5	0,000
%LT gd de epitelio						
Bulbo	≥1	83,33	5	10.00	3	0,001
Duod	≥1	83,33	5	16,67	5	0,003
%iNK de LIE						
Bulbo	≤20	100.00	6	53,33	16	0,062
Duod	≤20	100.00	6	30.00	9	0,003

Algunos pacientes con EEO presentan valores patológicos en alguno de los compartimentos del LIE, aunque sea en menor número que los EC. El 70% (26/37) de los pacientes EEO presentaba alteración en al menos un compartimento del LIE. El 19% (7/37) tenía alteración en dos de los compartimentos del LIE: en 4 se encontraban elevados en alguna porción de duodeno los LIEs respecto de CEI y disminuidas las iNK y en 3 estaban elevados los LT y δ con disminución de las iNK.

El resto de los análisis realizados pretenden investigar la existencia de factores clínicos o analíticos potencialmente modificadores del LIE en EEO.

6.1. Análisis de factores potencialmente modificadores del LIE duodenal en EEO

6.1.1. LIE duodenal y datos demográficos

Los análisis realizados en relación al género de los pacientes no han revelado diferencias significativas en la composición de los LIEs. Los niños tienen con más frecuencia EEO, pero los niños con EEO no asocian con más frecuencia que las niñas alteraciones en el LIE duodenal. Sin embargo, la edad sí que parece determinar el porcentaje de iNK intestinal, de modo que a mayor edad, mayor es el número de pacientes en los que este compartimento se encuentra disminuido ($\leq 20\%$). Se dividió a los pacientes inicialmente en tres categorías por edad (<5 ; 5-10, >10 años) pero dada la reducida muestra de niños < 5 años, creamos finalmente 2 grupos (≤ 10 años y >10 años) y comparamos los LIEs entre ellos obteniendo significación estadística en el % iNK respecto de los LIEs en duodeno $\leq 20\%$: 2/18 (11,1%) vs 9/18 (50%) respectivamente ($p=0,027$).

6.1.2. LIE duodenal y síntomas

Se ha estudiado si existe una asociación entre los síntomas (descritos en el apartado de **Clínica**) y las alteraciones en el LIE de los pacientes con EEO. Encontramos que los pacientes con vómitos (4/16) asociaban un aumento del % LIEs en bulbo $\geq 12\%$ respecto a los que no vomitaban (0/18) ($p=0,026$). El resto de los síntomas no parecen asociar alteraciones en ninguno de los compartimentos del LIE estudiados ($p>0.05$).

6.1.3. LIE duodenal e infección por *Helicobacter Pylori* (HP)

Está descrito que la infección por HP produce linfocitosis duodenal. Se analizó su influencia en el LIE, tanto de la población EC como EEO.

Tabla 32. LIE duodenal patológico en pacientes EEO con o sin infección por HP

		HP no		HP sí		
		%	n	%	n	p
%LIE de CEI						
Bulbo ^A	≥12	12,5	3	0,0	0	0,555
Duod ^B	≥12	16,0	4	14,3	1*	1
%LTgd de LIE						
Bulbo ^A	≥10	25,0	6	0,0	0	0,296
Duod ^B	≥10	32,0	8	0,0	0	0,150
%LT gd de epitelio						
Bulbo ^A	≥1	16,7	4	0,0	0	0,550
Duod ^B	≥1	28,0	7	0,0	0	0,300
%iNK de LIE						
Bulbo ^A	≤20	54,2	13	62,5	5	1
Duod ^B	≤20	32,0	8	14,3	1	0,640

Tamaño de muestra. ^A: HP no 24; HP sí 8; ^B HP no 25; HP sí 7.

La frecuencia de alteraciones en el LIE duodenal de pacientes EEO con HP es menor que en los pacientes EEO sin la infección, sin embargo estas diferencias no fueron significativas. El mismo análisis se llevó a cabo en los pacientes EC y tampoco se encontraron diferencias significativas.

Algunos pacientes con EEO estaban en tratamiento con IBP antes de la EDA. Los IBPs podrían modificar el efecto de la infección por HP sobre el LIE duodenal. De los 8 pacientes con HP, 4 (50%) estaban en tratamiento con IBP. Sólo uno de los que no estaban en tratamiento con IBP presentó un %LIE de CEI=12% (marcado * en la tabla X). El resto del LIE fue normal para los compartimentos linfocitarios de bulbo y duodeno, independientemente de si estaban en tratamiento con IBP o no. Las diferencias en el % de iNK no fueron significativas.

6.1.4. LIE duodenal y pruebas de laboratorio

6.1.4.1. LIE y IgE total.

Los pacientes con IgE total alta no mostraron diferencias significativas en las alteraciones en el LIE respecto a los pacientes con IgE total normal (Tabla 33).

Tabla 33. LIE duodenal patológico en pacientes EEO con IgE alta o normal

EoE	IgE				p
	Normal		Alta		
	n	%	n	%	
%LIE bulbo ≥12% ^A	1	16,7%	2	8,0%	0,488
%LIE duodeno ≥12% ^B	1	20,0%	3	11,1%	0,512
%LT gd LIE bulbo ≥10% ^A	2	33,3%	4	16,0%	0,567
%LT gdLIE duodeno ≥10% ^B	2	40,0%	5	18,5%	0,296
%LT gd LIE epitelio bulbo ≥1% ^A	1	16,7%	2	8,0%	0,488
%LT gd LIE epitelio duodeno ≥1% ^B	2	40,0%	3	11,1%	0,163
%INK LIE bulbo <20% ^A	4	66,7%	11	44,0%	0,394
% INK LIE duodeno <20% ^B	2	40,0%	7	25,9%	0,604

Tamaño de muestra. ^A: IgE normal 6, IgE alta 25; ^B: IgE normal 5, IgE alta 27.

6.1.4.2. LIE y pruebas de alergia IgE mediada.

Se consideraron pacientes con pruebas de alergia IgE mediada positivas si tenían IgE total alta y/o IgE específica positiva y/o test cutáneo positivo a algún alimento. No se encontraron diferencias significativas en las alteraciones encontradas en el LIE duodenal en pacientes EEO con o sin positividad para dichas pruebas (Tabla 34).

Tabla 34. LIE duodenal patológico en pacientes EEO con pruebas de alergia IgE + vs -

EoE	Pruebas alergia IgE mediada positivas				p
	No		Sí		
	n	%	n	%	
%LIE bulbo ≥12% ^A	1	20,0%	3	10,0%	0,477
%LIE duodeno ≥12% ^B	2	50,0%	4	12,5%	0,121
%LT gd LIE bulbo ≥10% ^A	1	20,0%	6	20,0%	1
%LT gdLIE duodeno ≥10% ^B	1	25,0%	7	21,9%	1
%LT gd LIE epitelio bulbo ≥1% ^A	1	20,0%	3	10,0%	0,477
%LT gd LIE epitelio duodeno ≥1% ^B	2	50,0%	5	15,6%	0,163
%INK LIE bulbo <20% ^A	3	60,0%	16	53,3%	1
% INK LIE duodeno <20% ^B	1	25,0%	10	35,2%	1

Tamaño de muestra. ^A: Pruebas IgE+ No 5, Pruebas IgE+ Sí 30; ^B: Pruebas IgE+ No 4, Pruebas IgE+ Sí 32.

6.1.4.3. LIE y eosinófilos en sangre periférica

Se analizó si la presencia de eosinofilia (eosinófilos en sangre periférica > 450 / μ L) se asociaba a alguna alteración en el LIE duodenal de los pacientes con EoE. No se encontraron diferencias significativas (Tabla 35).

Tabla 35. LIE duodenal patológico en pacientes EEO con o sin eosinofilia

EoE	Eosinófilos en sangre periférica				p*
	No		Sí		
	n	%	n	%	
%LIE de CEI bulbo ≥12% ^A	1	9,1%	3	13,6%	1
%LIE de CEI duodeno ≥12% ^B	0	0,0%	6	26,1%	0,145
%LT gd de LIE bulbo ≥10% ^A	1	9,1%	5	22,7%	0,637
%LT gd de LIE duodeno ≥10% ^B	2	18,2%	5	21,7%	1
%LT gd LIE epitelio bulbo ≥1% ^A	0	0,0%	3	13,6%	0,534
%LT gd LIE epitelio duodeno ≥1% ^B	1	9,1%	6	26,1%	0,384
%INK LIE bulbo <20% ^A	6	54,5%	12	54,5%	1
% INK LIE duodeno <20% ^B	2	18,2%	9	39,1%	0,271

*Fisher's exact

Sin embargo cuando analizamos la variable en su forma cuantitativa, se encontró que el % LIE del total de CEI alterado (≥ 12) en duodeno, se asociaba de forma estadísticamente significativa con un mayor número de eosinófilos en sangre periférica (Tabla 36).

Tabla 36. Eosinófilos en sangre periférica y LIE en duodeno

	n	Media	DT	[95% Conf. Interval]	
%LIE de CEI duodeno <12%	28	545.7143	240.6231	452.4104	639.0182
%LIE de CEI duodeno $\geq 12\%$	5	980	142.6534	802.8724	1157.128

t-test para varianzas iguales $p < 0,001$ ($p = 0,0005$)

En la figura 9 está representado el gráfico que muestra la diferencia ($p < 0,001$) en el número de eosinófilos en sangre periférica según el paciente con EEO

presente o no un % de LIEs respecto de CEI en duodeno patológico. Los pacientes con el % de LIEs en duodeno patológico presentan un mayor número de eosinófilos en sangre periférica que los que tienen un % LIEs normal.

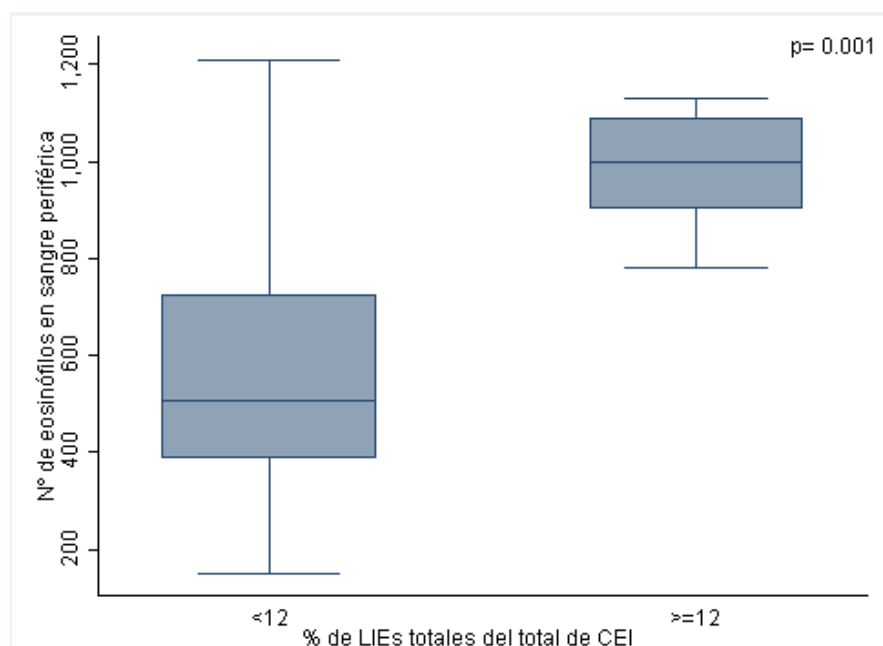


Figura 9. Gráfico box-plot de %LIE del total de CEI para eosinófilos en sangre periférica en pacientes con EEO.

Para la obtención de los puntos de corte en los valores de eosinófilos en sangre periférica que ayudasen a predecir la existencia de un porcentaje de LIEs del total de CEI en duodeno patológico ($\geq 12\%$), se utilizaron las curvas ROC. Se eligieron los puntos de corte que mostraban un mayor equilibrio entre especificidad y sensibilidad (Figura 10).

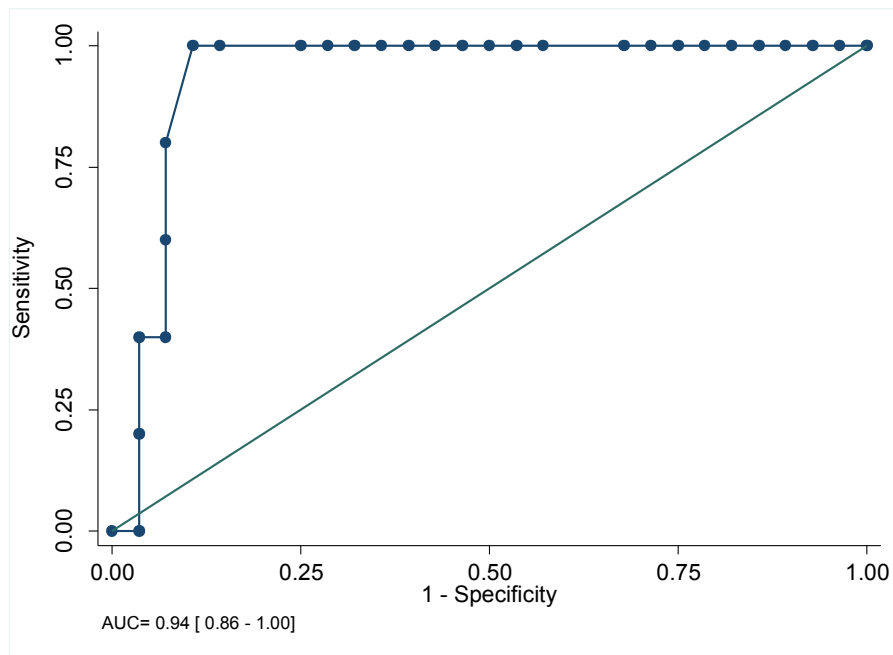


Figura 10. Puntos de corte de eosinófilos en sangre periférica para %LIE del total de CEI patológico.

El punto de corte que mejor sensibilidad y especificidad ofrecía a partir de la curva ROC fue de 780 eos/ μ l. Con estos resultados podemos anticipar que un paciente pediátrico con EEO tiene alterado el porcentaje de LIEs del CEI en duodeno cuando la cifra de eosinófilos en sangre periférica supera los 780/ μ l con una sensibilidad del 100% y una especificidad de casi el 90%, (LH+ =9,333, LH-= 0,00) (Tabla 37).

Tabla 37. Informe curva ROC sobre la sensibilidad y especificidad del nº de eosinófilos en sangre periférica para detectar % LIEs de CEI patológicos (≥12%) en duodeno

Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Correctly Classified	LR+	LR-
(>= 150)	100.00%	0.00%	15.15%	1.0000	
(>= 180)	100.00%	3.57%	18.18%	1.0370	0.0000
(>= 270)	100.00%	7.14%	21.21%	1.0769	0.0000
(>= 290)	100.00%	10.71%	24.24%	1.1200	0.0000
(>= 310)	100.00%	14.29%	27.27%	1.1667	0.0000
(>= 350)	100.00%	17.86%	30.30%	1.2174	0.0000
(>= 380)	100.00%	21.43%	33.33%	1.2727	0.0000
(>= 390)	100.00%	25.00%	36.36%	1.3333	0.0000
(>= 410)	100.00%	28.57%	39.39%	1.4000	0.0000
(>= 450)	100.00%	32.14%	42.42%	1.4737	0.0000
(>= 470)	100.00%	42.86%	51.52%	1.7500	0.0000
(>= 480)	100.00%	46.43%	54.55%	1.8667	0.0000
(>= 530)	100.00%	50.00%	57.58%	2.0000	0.0000
(>= 540)	100.00%	53.57%	60.61%	2.1538	0.0000
(>= 580)	100.00%	57.14%	63.64%	2.3333	0.0000
(>= 610)	100.00%	60.71%	66.67%	2.5455	0.0000
(>= 620)	100.00%	64.29%	69.70%	2.8000	0.0000
(>= 700)	100.00%	67.86%	72.73%	3.1111	0.0000
(>= 720)	100.00%	71.43%	75.76%	3.5000	0.0000
(>= 730)	100.00%	75.00%	78.79%	4.0000	0.0000
(>= 750)	100.00%	85.71%	87.88%	7.0000	0.0000
(>= 780)	100.00%	89.29%	90.91%	9.3333	0.0000
(>= 900)	80.00%	92.86%	90.91%	11.2000	0.2154
(>= 1000)	60.00%	92.86%	87.88%	8.4000	0.4308
(>= 1020)	40.00%	92.86%	84.85%	5.6000	0.6462
(>= 1090)	40.00%	96.43%	87.88%	11.2000	0.6222
(>= 1130)	20.00%	96.43%	84.85%	5.6000	0.8296
(>= 1210)	0.00%	96.43%	81.82%	0.0000	1.0370
(> 1210)	0.00%	100.00%	84.85%		1.0000

6.1.5. LIE duodenal y hallazgos endoscópicos

Los hallazgos endoscópicos tienden a ser menos reproducibles que otras variables analizadas ya que dependen de la subjetividad del observador (endoscopista). Aún así se analizaron las alteraciones en el LIE de pacientes EEO con signos de gastritis en la EDA vs los que no tenían dichos signos y no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) para todos los compartimentos del LIE). Del mismo modo se procedió con los signos

sugerentes de EEO (presencia de alguno o varios de los siguientes: traquealización, exudados, surcos longitudinales, edema, estenosis, y fragilidad mucosa) en la EDA con resultados similares ($p>0,05$).

6.1.6. LIE duodenal y hallazgos histológicos

6.1.6.1. LIE y nº de eosinófilos en mucosa esofágica

Se analizó si la actividad de la EEO se asociaba a alguna alteración en el LIE duodenal de los pacientes con EEO. No se encontraron diferencias significativas cuando la variable era categórica para ese punto de corte (eosinófilos en mucosa esofágica $\geq 15/\text{CGA}$). Sin embargo cuando se analizó la variable en su forma cuantitativa, se encontró que el porcentaje de LIE del total de CEI alterado (≥ 12) en duodeno, se asocia de forma estadísticamente significativa con un mayor número de eosinófilos en mucosa esofágica como ocurría en relación a los eosinófilos en sangre periférica (Figura 11), con una $p=0,021$ y una curva ROC que mostraba un $\text{AUC}=0,76$ (Figura 12). El punto de corte que mejor sensibilidad y especificidad ofrecía a partir de la curva ROC era de 45 eos/CGA. Con estos resultados podemos anticipar que un paciente pediátrico con EEO tiene alterado el porcentaje de LIEs del CEI en duodeno cuando la cifra de eosinófilos en mucosa esofágica supera los 45 eos/CGA con una sensibilidad del 67% y una especificidad del 83%, ($\text{LH}+ =4,0$, $\text{LH}- = 0,4$) (Tabla 38).

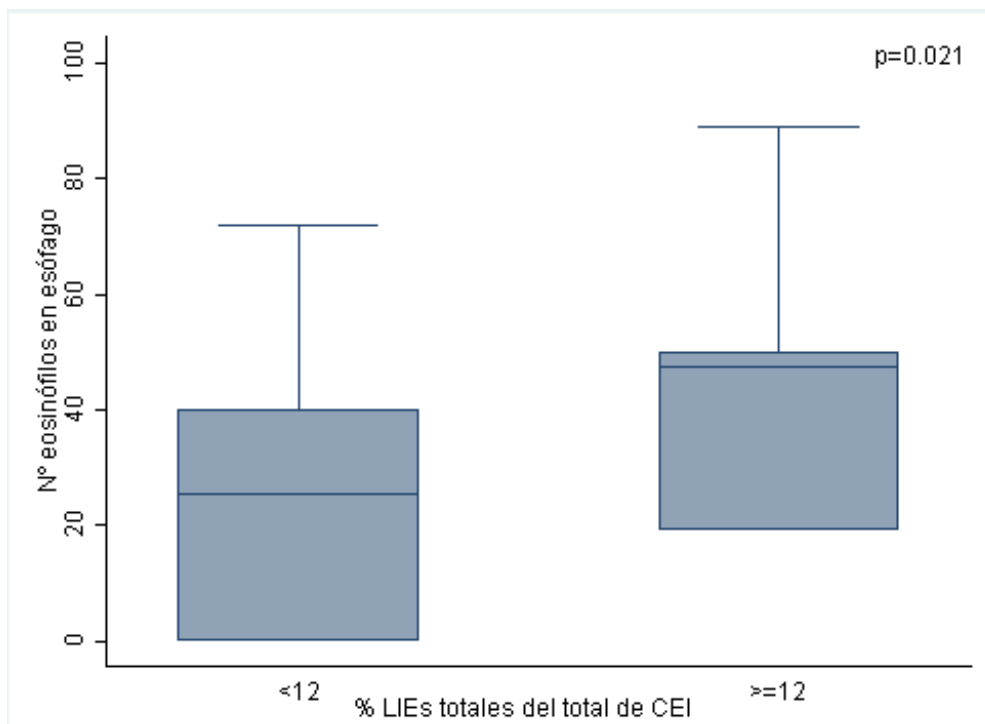


Figura 11. Gráfico box-plot de %LIE del total de CEI para eosinófilos en mucosa esofágica en pacientes con EEO

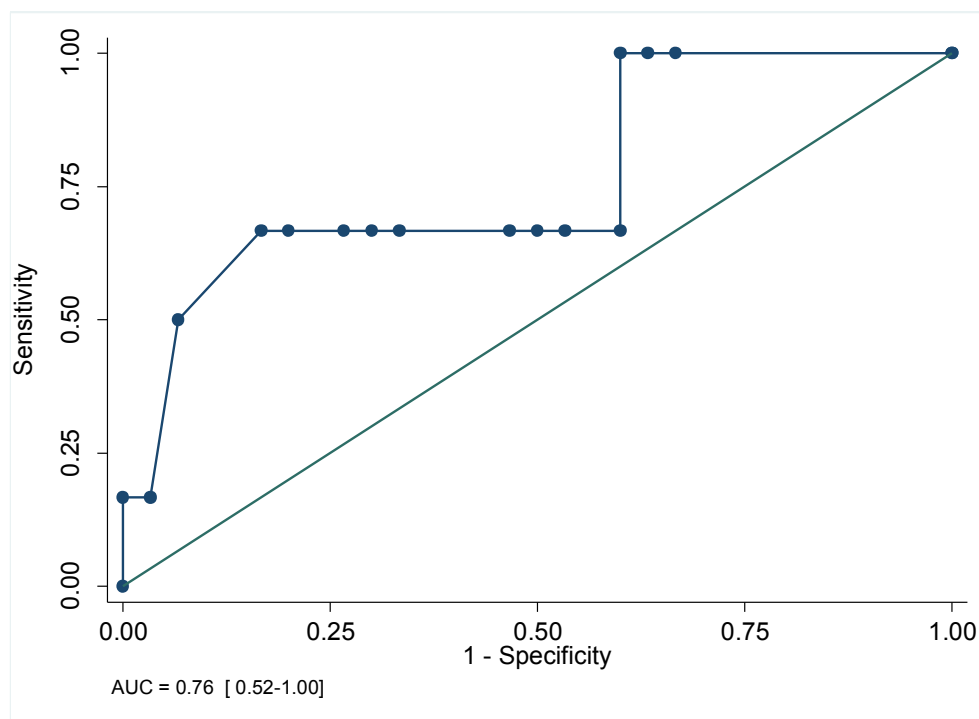


Figura 12. Curva ROC para un punto de corte en el nº de eosinófilos de mucosa esofágica que asocie alteración en el %LIE del total de CEI en duodeno.

Tabla 38. Informe curva ROC sobre la sensibilidad y especificidad del nº de eosinófilos en mucosa esofágica para detectar % LIEs de CEI patológicos ($\geq 12\%$) en duodeno de pacientes con EEO

Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Correctly Classified	LR+	LR-
(≥ 0)	100.00%	0.00%	16.67%	1.0000	
(≥ 13)	100.00%	33.33%	44.44%	1.5000	0.0000
(≥ 15)	100.00%	36.67%	47.22%	1.5789	0.0000
(≥ 19)	100.00%	40.00%	50.00%	1.6667	0.0000
(≥ 20)	66.67%	40.00%	44.44%	1.1111	0.8333
(≥ 24)	66.67%	46.67%	50.00%	1.2500	0.7143
(≥ 27)	66.67%	50.00%	52.78%	1.3333	0.6667
(≥ 30)	66.67%	53.33%	55.56%	1.4286	0.6250
(≥ 32)	66.67%	66.67%	66.67%	2.0000	0.5000
(≥ 35)	66.67%	70.00%	69.44%	2.2222	0.4762
(≥ 40)	66.67%	73.33%	72.22%	2.5000	0.4545
(≥ 42)	66.67%	80.00%	77.78%	3.3333	0.4167
(≥ 45)	66.67%	83.33%	80.56%	4.0000	0.4000
(≥ 50)	50.00%	93.33%	86.11%	7.5000	0.5357
(≥ 72)	16.67%	96.67%	83.33%	5.0000	0.8621
(≥ 89)	16.67%	100.00%	86.11%		0.8333
(> 89)	0.00%	100.00%	83.33%		1.0000

6.1.6.2. LIE y gastritis en el estudio histológico (AP)

Puesto que la distribución de gastritis AP en el grupo EEO tan solo incluye 5 pacientes con gastritis crónica con actividad, estos se han agrupado con los pacientes con gastritis AP crónica sin actividad (7), de manera que se forman dos grupos, sin gastritis AP y con gastritis AP crónica (sin/con actividad). No se encontraron diferencias significativas en el LIE de los pacientes con EEO en los que existía gastritis crónica vs sin gastritis (Tabla 39).

Tabla 39. LIE en pacientes EEO con y sin gastritis en el estudio histológico (AP)

EoE	Gastritis AP				total		p
	No (n=12)		Sí (n=24)				
	n	%	n	%	n	%	
%LIE RyC bulbo ≥12% ^A	1	8,3%	3	13,0%	4	11,4%	1,000
%LIE RyC duodeno ≥12% ^B	2	16,7%	4	17,4%	6	17,1%	1,000
%LT gd LIE RyC bulbo ≥10% ^A	5	41,7%	3	13,0%	8	22,9%	0,091
%LT gdLIE RyC duodeno ≥10% ^B	4	33,3%	5	21,7%	9	25,7%	0,685
%LT gd LIE RyC epitelio bulbo ≥1% ^A	2	16,7%	3	13,0%	5	14,3%	1,000
%LT gdLIE RyC epitelio duodeno ≥1% ^B	3	25,0%	5	21,7%	8	22,9%	1,000
%INK LIE RyC bulbo <20% ^A	7	58,3%	12	52,2%	19	54,3%	1,000
% INK LIE RyC duodeno <20% ^B	6	50,0%	5	21,7%	11	31,4%	0,130

Tamaño de muestra. ^A Gastritis EDA no 12, Gastritis EDA si 23.

6.1.6.3. LIE y clasificación Marsh

Se analizó si el estadiaje Marsh se asociaba a alteración en el LIE de los pacientes con EEO. No encontramos diferencias significativas, aunque los LIEs respecto del total de CEI en duodeno estaban alterados en un mayor porcentaje en los Marsh 1 con $p = 0,058$ (Tabla 40).

Tabla 40. LIE en pacientes EEO en función del estadiaje Marsh.

EoE	Marsh				p
	Marsh 0		Marsh 1		
	n	%	n	%	
%LIE bulbo ≥12% ^A	3	10,0%	1	20,0%	0,48
%LIE duodeno ≥12% ^B	4	12,5%	2	50,0%	0,058
%LT gd LIE bulbo ≥10% ^A	6	20,0%	1	20,0%	1
%LT gdLIE duodeno ≥10% ^B	7	21,9%	1	25,0%	1
%LT gd LIE epitelio bulbo ≥1% ^A	3	10,0%	1	20,0%	0,477
%LT gdLIE epitelio duodeno ≥1% ^B	5	15,6%	2	50,0%	0,163
%INK LIE bulbo <20% ^A	17	56,7%	2	40,0%%	0,642
% INK LIE duodeno <20% ^B	10	31,25%	1	25,0%	1

Tamaño de muestra. ^A Marsh 0 :30; Marsh 1:5, ^B Marsh 0:32; Marsh 1:4

6.1.7. LIE duodenal y tratamiento recibido

6.1.7.1. Sin tratamiento

Los pacientes sin tratamiento que seguían una dieta libre y no tomaban ninguna medicación se compararon con los que seguían alguna dieta y/o tomaban alguna medicación. La alteración en los LIEs no se asoció a la falta de tratamiento en los pacientes EoE ($p>0.05$) (Tabla 41).

Tabla 41. LIE patológico en pacientes con EoE tratados vs no tratados

	Grupo EoE						
	Con tto				total		
	preEDA		Sin tto preEDA				
	(n=33)		(n=4)		n	%	p
	n	%	n	%	n	%	p
%LIE bulbo ≥12% ^A	4	13,3%	1	25,0%	5	14,3	0,581
%LIE duodeno ≥12% ^B	6	19,4%	1	25,0%	7	19,4	1,000
%LT gd LIE bulbo ≥10% ^A	7	23,3%	1	25,0%	8	22,9	1,000
%LT gdLIE duodeno ≥10% ^B	8	25,8%	0	0,0%	8	22,2	0,566
%LT gd LIE epitelio bulbo ≥1% ^A	5	16,7%	0	0,0%	5	14,3	1,000
%LT gdLIE epitelio duodeno ≥1% ^B	7	22,6%	1	25,0%	8	22,2	1,000
%INK LIE bulbo <20% ^A	18	60,0%	2	50,0%	20	57,1	0,631
% INK LIE duodeno <20% ^B	10	32,3%	2	50,0%	12	33,3%	1,000

Tamaño de muestra. ^A: Con tto preEDA 30, Sin tto preEDA 4; ^B: Con tto preEDA 31, Sin tto preEDA 4.

6.1.7.2. Tratamiento dietético exclusivo

Se registraron 15 pacientes en tratamiento dietético exclusivo y 22 que seguían otros tratamientos o sin tratamiento. La alteración en los LIEs no se asoció a la ausencia de tratamiento dietético en los pacientes EEO ($p>0.05$) (Tabla 42).

Tabla 42. LIE patológico en pacientes con EEO en tratamiento dietético exclusivo vs no tratados u otros tratamientos

	Grupo EEO						
	Sin tto dietético		Con tto dietético				
	exclusivo (n=22)		exclusivo (n=15)		total		
	n	%	n	%	n	%	p
%LIE bulbo $\geq 12\%$ ^A	5	22,7%	0	0,0%	5	14,3%	0,134
%LIE duodeno $\geq 12\%$ ^B	5	23,8%	2	13,3%	7	19,4%	0,674
%LT gd LIE bulbo $\geq 10\%$ ^A	5	22,7%	3	23,1%	8	22,9%	1,000
%LT gdLIE duodeno $\geq 10\%$ ^B	5	23,8%	3	20,0%	8	22,2%	1,000
%LT gd LIE epitelio bulbo $\geq 1\%$ ^A	3	13,6%	2	15,4%	5	14,3%	1,000
%LT gdLIE epitelio duodeno $\geq 1\%$ ^B	6	28,6%	2	13,3%	8	22,2%	0,424
%INK LIE bulbo $<20\%$ ^A	13	59,1%	7	53,8%	20	57,1%	1,000
% INK LIE duodeno $<20\%$ ^B	6	28,6%	6	40,0%	12	33,3%	0,499

Tamaño de muestra. ^A: Sin tto dietético preEDA 22, Con tto dietético preEDA 13; ^B: Sin tto dietético preEDA 21, Con tto dietético preEDA 15.

6.1.7.3. Tratamiento exclusivo con IBP

Se registraron 8 pacientes en tratamiento exclusivo con IBP y 29 pacientes que no se trataron con IBP o que asociaban otro tratamiento. La alteración en los LIEs no parece asociarse al tratamiento con IBPs en los pacientes con EEo ($p>0.05$) (Tabla 43).

Tabla 43. LIE patológico en pacientes con EEo en tratamiento exclusivo con IBP vs no tratados exclusivamente con IBP

	Grupo EoE							
	Sin IBPs				Con IBPs			
	exclusivo (n=29)		exclusivo (n=8)		total			
	n	%	n	%	n	%	p	
%LIE bulbo $\geq 12\%$ ^A	2	7,4%	3	37,5%	5	14,3%	0,067	
%LIE duodeno $\geq 12\%$ ^B	5	17,9%	2	25,0%	7	19,4%	0,639	
%LT gd LIE bulbo $\geq 10\%$ ^A	7	25,9%	1	12,5%	8	22,9%	0,648	
%LT gd LIE duodeno $\geq 10\%$ ^B	7	25,0%	1	12,5%	8	22,2%	0,651	
%LT gd LIE epitelio bulbo $\geq 1\%$ ^A	4	14,8%	1	12,5%	5	14,3%	1,000	
%LT gd LIE epitelio duodeno $\geq 1\%$ ^B	6	21,4%	2	25,0%	8	22,2%	1,000	
%INK LIE bulbo $<20\%$ ^A	14	51,9%	6	75,0%	20	57,1%	0,419	
%INK LIE duodeno $<20\%$ ^B	10	35,7%	2	25,0%	12	33,3%	0,691	

Tamaño de muestra. ^A: Sin IBPs exclusivo preEDA 27, Con IBPs exclusivos preEDA 8; ^B: Sin IBPs preEDA 28, Con IBPs preEDA 8.

6.1.7.4. Tratamiento con corticoides deglutidos

Sólo 1 paciente se encontraba en tratamiento con corticoides deglutidos preEDA (Fluticasona MDI deglutida 500 µg/12 h). Sin embargo, dicho paciente no hacía dieta libre (dieta sin gluten, sin leche), por lo que se incluyó en el grupo de tratamiento combinado.

6.1.7.5. Tratamiento combinado (tratamiento dietético y algún tratamiento médico)

Se registraron 10 pacientes en tratamiento combinado, 9 con tratamiento dietético más IBP, y 1 en tratamiento dietético y corticoide deglutido.

Analizamos el LIE de los pacientes con uno u otro tratamiento, sin encontrar diferencias significativas (Tabla 44).

Tabla 44. LIE patológico en pacientes con EEO en tratamiento combinado vs otros tratamientos/sin tratamiento.

	Grupo EoE							
	Sin tratamiento				Tratamiento			
	combinado		combinado		total			
	n	%	n	%	n	%	p	
%LIE bulbo $\geq 12\%$ ^A	4	15,4%	1	11,1%	5	14,3%	1,000	
%LIE duodeno $\geq 12\%$ ^B	6	21,4%	1	12,5%	7	19,4%	1,000	
%LT gd LIE bulbo $\geq 10\%$ ^A	5	19,2%	3	33,3%	8	22,9%	0,396	
%LT gdLIE duodeno $\geq 10\%$ ^B	4	14,3%	4	50,0%	8	22,2%	0,054	
%LT gd LIE epitelio bulbo $\geq 1\%$ ^A	3	11,5%	2	22,2%	5	14,3%	0,586	
%LT gdLIE epitelio duodeno $\geq 1\%$ ^B	5	17,9%	3	37,5%	8	22,2%	0,338	
%INK LIE bulbo $< 20\%$ ^A	15	57,7%	5	55,6%	20	57,1%	1,000	
% INK LIE duodeno $< 20\%$ ^B	10	35,7%	2	25,0%	12	33,3%	0,691	

Tamaño de muestra. ^A: Sin tto dietético o tto médico 26, Con tto dietético y tto médico 9; ^B: Sin tto dietético o tto médico 28, Con tto dietético y tto médico 8.

VII. DISCUSIÓN

En esta tesis hemos estudiado si los LIEs duodenales de niños con EEO sufren modificaciones en la cantidad y/o la distribución de las subpoblaciones, lo que podría sugerir que jueguen un papel en la patogenia de la EEO, como actores indiscutibles en la modulación de la tolerancia oral y de las respuestas inflamatorias de la mucosa gastrointestinal. Esto ya ha sido demostrado en la EC pero también en otras enfermedades donde se afectan otros órganos distintos del intestino delgado. Rostoker G et al demostraron un aumento significativo de los LIEs intestinales en pacientes con glomerulonefropatías primarias, sugiriendo que la pérdida de la tolerancia oral podría tener un importante rol en la patogenia de la enfermedad ⁽³⁶⁾.

En las últimas dos décadas, la esofagitis eosinofílica (EEO) ha sufrido una notable transformación. Lo que solía ser una enfermedad rara, que se publicaba en casos aislados y sobre la que se conocía poco, es ahora ampliamente reconocida como una causa importante de morbilidad en el tracto digestivo superior. La EEO suscita desde hace años una intensa actividad investigadora. Se ha definido el síndrome clínico, se han realizado ensayos de tratamiento y se han publicado consensos y guías para su manejo ^(37, 42, 52). En paralelo se ha producido un incremento en nuestra comprensión de la patogénesis y de las bases genéticas de la enfermedad ⁽⁵⁰⁾. Si bien se ha demostrado y aceptado que la EEO es una condición alérgica / inmunomediada en la que el eosinófilo juega un papel central, investigaciones recientes sugieren que otros tipos celulares distintos de los eosinófilos desempeñan asimismo funciones importantes, y en ocasiones cruciales. Entre los otros tipos

de células implicadas en la patogénesis de EEO se incluyen los linfocitos (21, 162), mastocitos (58), fibroblastos (47), células epiteliales (55) e iNKT (59). Reconocer y caracterizar el papel de estos tipos de células no-eosinófilas parece fundamental para el avance en el diagnóstico y tratamiento de la EEO. Esta tesis pretende dar un paso más y salir no sólo del eosinófilo sino también del esófago, para intentar añadir al conocimiento actual una visión más integradora del sistema inmune de la mucosa en la alergia gastrointestinal: del eosinófilo al linfocito intraepitelial y del esófago al intestino, donde asientan las estructuras y los mecanismos para la tolerancia oral. La ruptura en la tolerancia oral está en la base de las enfermedades alérgicas, por tanto la patogenia de la EEO debería explicarse de algún modo desde el abanico de interacciones celulares y moleculares que controlan el fino engranaje de la tolerancia oral. Los LIEs parecen jugar un papel decisivo en la regulación de la homeostasis de la mucosa intestinal. Hemos utilizado el modelo de la EC por ser una enfermedad desencadenada por la pérdida de tolerancia oral a un antígeno de la dieta (el gluten) donde el estudio del LIE ha demostrado su implicación en la patogenia de la enfermedad y está ampliamente caracterizado ^(17, 143, 144), para iniciar una línea de investigación que resulta prometedora. La implicación de los LIEs intestinales en la patogenia de la EEO puede ayudar a definir los subfenotipos clínicos de la EEO y por tanto a optimizar su manejo y quizá a desarrollar terapias nuevas o combinadas.

La hipótesis de una posible alteración de los LIEs en la mucosa intestinal de los pacientes pediátricos con EEO, se sustenta en las descripciones previas de pacientes con alergia alimentaria ^(141, 168). Realizamos un estudio transversal en

pacientes con EEO y EC que necesitaron una EDA con toma de biopsias como parte de su proceso diagnóstico-terapéutico. Comparamos los hallazgos del LIE de los pacientes con EEO con el de los pacientes con EC. Inicialmente analizamos si nuestra población tenía una presentación epidemiológica y clínica acorde a lo descrito en la literatura para la EEO pediátrica. Para ello clasificamos a los pacientes con EEO según el número de eosinófilos en mucosa esofágica en EEO activa (≥ 15 eos/CGA) y EEO no activa (< 15 eos/CGA). El 67,6% de los pacientes con EEO tenían actividad. Sólo el 29,7% estaban en período de remisión de la infiltración eosinofílica esofágica. Estos primeros resultados no se pueden comparar con las tasas de remisión de otros estudios publicados dada la naturaleza transversal del nuestro con una única EDA, ya que no era el objetivo del mismo analizar la eficacia de los tratamientos.

En cuanto a los datos demográficos, encontramos que la frecuencia de niños con EEO era 5 veces mayor que en niñas. Estos resultados son superiores a los publicados, aunque las tasas varían en la literatura, una revisión sistemática reciente informa de una $OR=2,01$ ^(38, 41, 43) donde los varones tienen por tanto un mayor riesgo que las mujeres de padecer EEO. La razón de esta diferencia de género aún no se ha explicado, pero se ha identificado un polimorfismo de un único nucleótido en el gen para la TSL en el cromosoma Xp22.3 y también en el cromosoma Yp11.3. Estos hallazgos podrían explicar la mayor prevalencia de EEO en los hombres ⁽⁴⁴⁾. Sin embargo al dividir los pacientes con EEO en activa vs no activa no encontramos diferencias por género. Es decir, ser niño o niña no parece un factor pronóstico para el control de la enfermedad.

La frecuencia de niñas con EC era 7 veces mayor que en niños, de nuevo más elevada que la tasa publicada de 2:1 de mujeres frente a varones. Nuestros resultados están afectados por la limitación de la reducida muestra de pacientes con EC.

Ambas poblaciones de EEO y EC eran homogéneas en cuanto a edad y medidas antropométricas: el peso y la talla de los pacientes en ambos grupos (EEO vs EC) fueron muy similares. Estudiamos si la edad o la antropometría determinaba la actividad de la enfermedad en la EEO sin encontrar diferencias significativas.

Los pacientes con EEO sufren con frecuencia otras enfermedades atópicas, como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica y alergia alimentaria IgE mediada. La atopia se ha descrito en el 50-80% de los pacientes con EEO ^(63, 64, 169). Sin embargo, en una revisión sistemática reciente en la que se incluyeron 21 estudios, se encontró que los criterios de atopia no estaban claramente definidos. A pesar de ello se estimó que la rinitis alérgica era significativamente más frecuente en los EEO que en los grupos control (odds ratio [OR]: 5.09) así como el asma (OR: 3.01) y la dermatitis atópica (OR: 2.85). En otros estudios se ha descrito que el 15-43% de los pacientes con EEO tienen también alergia IgE mediada a alimentos ⁽¹⁷⁰⁾. En nuestro estudio se ha encontrado que el 91,9% de los pacientes con EEO presentaban antecedentes personales de enfermedad atópica, frente al 50-80% descrito en la literatura, con diferencias significativas respecto a los pacientes celíacos para el asma (44,4% vs 0,0% respectivamente, $p=0,04$) y para la alergia a alimentos IgE mediada (67,5% vs 0,0% respectivamente, $p<0,001$).

En una publicación reciente, Atkins D et al, proponen una posible clasificación de la EEO según potenciales fenotipos, donde el perfil atópico puede ayudar a clasificar a estos pacientes. Algunos tienen asma grave, dermatitis atópica de difícil manejo y múltiples alergias IgE mediadas, mientras que otros tienen una rinoconjuntivitis leve. Podría ser similar al asma donde en 1/3 de los niños que presentan sibilancias a una edad temprana en el contexto de infecciones víricas desaparece el asma con la edad, mientras que en los que inician la clínica asmática con una edad más avanzada, el asma no desaparece. De igual forma, la presencia de otras enfermedades atópicas concomitantes al asma indican menor probabilidad de que ésta se supere ⁽¹⁷¹⁾. Podríamos hipotetizar, en línea con estas asociaciones en el asma, que los pacientes con EEO y atopia tendrían menor probabilidad de superar la enfermedad y que a mayor gravedad de las características atópicas peor respuesta a los tratamientos. Según lo expuesto, podemos considerar que los pacientes de nuestro estudio constituyen un grupo fenotípico complejo dentro de la EEO, puesto de manifiesto por las mayores tasas de atopia y en concreto de alergia IgE mediada a alimentos que las referidas en la literatura, esta selección quizá venga determinada porque los pacientes proceden de un hospital terciario de referencia para casos alérgicos complicados.

En los pacientes con EEO se estudió si los AP y AF de atopia se asociaban a actividad de la enfermedad. Encontramos que los pacientes con AP de dermatitis atópica (DA) (55,6%) tenían con más frecuencia EEO activa ($p= 0,034$). No encontramos diferencias significativas para el resto de antecedentes familiares y personales de manera separada (para asma, rinoconjuntivitis, dermatitis

atópica o alergia a alimentos,) ni cuando se agruparon en pacientes con atopia vs no atopia. Venturelli N. et al han sugerido mediante un modelo en ratones que la barrera cutánea alterada de los pacientes con DA actuaría como punto de entrada para la sensibilización alérgica desencadenando el desarrollo de EEO y que dicha sensibilización está mediada por el eje IL-33-ST2-basófilo ⁽¹⁷²⁾. En la EEO también se altera la función de barrera en el epitelio esofágico estando involucradas dos proteínas: la filagrina y la desmogleina-1(DSG-1). Se ha encontrado un SNP del gen de la filagrina (2282del4) en una cohorte de 365 pacientes con EEO en comparación con 165 sujetos sanos, mostrando una asociación significativa con la enfermedad (OR = 5,0) ⁽⁴⁹⁾. Por otro lado, se sabe que el déficit de filagrina predispone a la dermatitis atópica ⁽¹⁷³⁾ y que la expresión de DSG1 está disminuida en las lesiones de DA, cuya supresión está mediada por IL-4 e IL-13 ⁽¹⁷⁴⁾. La hiperplasia de células epiteliales esofágicas observadas en pacientes con EEO es secundaria a la disminución de la expresión de los genes que regulan la diferenciación epidérmica. La disminución de la expresión de DSG1 promueve la regulación positiva de la periostina, una proteína de la matriz extracelular que participa en la fibrosis del tejido conectivo del esófago ⁽⁵²⁾. Por lo tanto la DA no sólo predispone a la EEO por su papel en la sensibilización alérgica sino que ambas enfermedades parecen compartir alteraciones de vías moleculares comunes.

Nuestros resultados asociando la DA y la EEO activa no han sido reportados previamente. De confirmarse en estudios más amplios, supondría una importante contribución para la clasificación y el manejo de estos pacientes. El antecedente de DA actuaría como un factor de mal pronóstico para el control

de la enfermedad y podría determinar la elección de terapias más intensas desde el inicio del tratamiento.

Los síntomas que presentaban los pacientes con EEO y con EC no presentaron diferencias significativas entre sí, aunque la disfagia fue más frecuente como era esperable en el grupo EEO ($p=0,054$). Sin embargo la disfagia en los EEO sí fue significativamente mayor en el grupo de edad >10 años frente a los < 5 años y los que estaban entre los 5 y los 10 años ($p<0,001$). Esta forma de presentación es típica de adolescentes y adultos ^(40, 81). Se estudió también si los signos y síntomas se asociaban a actividad de la enfermedad. Se evidenció que los pacientes con EEO no activa presentaban distensión abdominal ($n=3$; 27,3%) con más frecuencia que los que tenían EEO activa ($p= 0,023$), sin que exista una explicación fisiopatológica razonable para dicho hallazgo, pudiendo estar determinado por factores como la edad o el reducido número de pacientes que presentaban el síntoma. No hubo diferencias significativas para el resto de signos y síntomas.

Se ha descrito un aumento de los LIEs duodenales en pacientes con déficit de IgA ⁽¹⁵⁹⁾. En las pruebas complementarias se registraron los niveles de IgA, que estuvieron en rango normal para la edad en todos los pacientes con EC ($139,6 \pm 59,1$) y en 32 de los 34 pacientes con EEO ($116,5 \pm 65,0$) en los que se registró. Se encontraron 2 pacientes del grupo EEO con déficit de IgA: una niña de 4 años y 6 m y un niño de 10 años y 3 meses. El LIE duodenal por citometría de flujo en estos pacientes no estaba alterado en ninguno de sus compartimentos, por lo que no los excluimos del estudio.

La EEO se asocia con niveles elevados de IgE total, así como sensibilización a alimentos y aeroalérgenos mediadas por IgE ⁽¹⁷⁵⁾. En una cohorte de EEO pediátrica, se observó sensibilización a alérgenos alimentarios y ambientales en el 75% y el 79%, respectivamente ⁽¹⁷⁶⁾. Sin embargo, los valores predictivos positivos para un alimento identificado por test cutáneo varían entre 26% y el 96%, con un promedio de 47% ⁽¹⁷⁷⁾. Además, las dietas de eliminación basadas únicamente en la sensibilización a alérgenos determinados por pruebas cutáneas y/o por IgE específica no son efectivas en un elevado número de pacientes ^(177, 178). En la actualidad no se recomienda el uso de las pruebas de alergia de forma exclusiva para guiar la terapia dietética en pacientes con EEO. En nuestro estudio, 27 (79,4%) pacientes tenían una IgE total elevada y al menos una IgE específica positiva para algún alimento. La IgE específica a PLV fue positiva en el 53% de pacientes y sólo un 21% de los niños en que se realizó el test cutáneo para PLV resultó positivo, a pesar de ser el alimento que con mayor frecuencia se ha encontrado como inductor de EEO (entre el 43-74% de los pacientes con EEO) ⁽⁸⁹⁾. La discordancia entre ambas pruebas alérgicas y la baja positividad de la prueba cutánea no es de extrañar si tenemos en cuenta que la EEO actualmente se considera mediada por mecanismos celulares y no por IgE ⁽¹⁷⁹⁾.

La endoscopia digestiva alta es imprescindible para el diagnóstico y seguimiento de la EEO. Se han descrito varias características morfológicas en el esófago de los pacientes sometidos a endoscopia y se han propuesto diversos esquemas de clasificación de estos hallazgos ⁽⁸⁴⁾; sin embargo, el

aspecto endoscópico sólo contribuye a la sospecha diagnóstica de la EEO, ya que se necesita confirmación histológica con la toma de biopsias.

Un metanálisis realizado en 2012, analizó los hallazgos endoscópicos de 4.678 pacientes con EEO y 2.742 controles revelando una modesta sensibilidad, VPP y VPN de las características endoscópicas para predecir inflamación eosinofílica esofágica ⁽⁸²⁾. En nuestro estudio, se objetivaron signos sugerentes de EEO en la EDA (exudados algodonosos, surcos longitudinales marcados, traquealización, estenosis, friabilidad de mucosa) en 30 (81,0%) pacientes con EEO. Al analizar si en los pacientes con EEO la descripción de los signos de EEO en la EDA se asociaba a la actividad de la enfermedad según el estudio anatomo-patológico, no se encontraron diferencias significativas ($p=0,403$). Estos resultados demuestran la escasa concordancia entre los hallazgos macroscópicos y la histología, al menos hasta que se validen e implementen scores endoscópicos pediátricos para la EEO.

La evaluación endoscópica es también necesaria en pediatría para la toma de biopsias con estudio histológico y/o microbiológico en la infección gástrica por *Helicobacter pylori*. Existe cada vez un mayor número de publicaciones que evidencian el papel protector de la infección por HP sobre la EEO ⁽¹⁸⁰⁻¹⁸²⁾. Recientemente Von Armin U. et al evaluaron la infección por HP en 58 pacientes adultos con EEO y 116 controles. Encontraron que sólo el 5,2% de EEO tenían evidencia serológica de la infección frente al 37,9% del grupo control ($p< 0,0001$) [odds ratio (OR) 0.24, 95% intervalo de confianza (CI) 0.11–0.50], concluyendo que la infección por HP se asociaba inversamente a la EEO ⁽¹⁸³⁾. En nuestro estudio, analizamos la presencia de infección por HP tanto

en pacientes con EEO como con EC. El porcentaje de infección HP en EEO fue de 24,2% y en EC de 37,5%, sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos. Tampoco encontramos un efecto protector del HP sobre la actividad de la EEO ($p=0,687$). La tasa de prevalencia de infección por HP en la población pediátrica española se encuentra en torno al 22%, similar a la de nuestros pacientes con EEO. Nuestros resultados no se corresponden con lo referido en la mayoría de estudios que han demostrado una asociación inversa entre la infección por HP y la eosinofilia esofágica. Tan sólo un estudio sistemático prospectivo en niños europeos encontró que la tasa de niños *Helicobacter pylori*-positivos tenían un mayor conteo de eosinófilos por CGA en la mucosa esofágica que los HP-negativos ⁽¹⁸⁴⁾. Estas diferencias en la literatura y con nuestra serie podrían deberse a la falta de uniformidad en las técnicas diagnósticas empleadas, al distinto origen de las poblaciones estudiadas y a las diferencias en la metodología utilizada en cada trabajo.

Los pacientes con EEO pueden recibir tratamiento médico (inhibidores de la bomba de protones (IBP), corticoides deglutidos u orales) y/o dietético (dietas de eliminación de alimentos o grupos de alimentos). Nuestra población de EEO en el momento del estudio recibía mayoritariamente tratamiento dietético, de forma exclusiva en 15 (40,5%) pacientes, todos ellos con actividad. Otros 10 (24,3%) recibían tratamiento combinado con dieta y medicación (9 IBPs, 1 Corticoide deglutido), de ellos 4 no presentaban actividad. En conjunto, el 16% de los pacientes que seguían alguna dieta de exclusión presentaba una EEO no activa. Se trata de un estudio transversal, no dirigido a evaluar la eficacia del tratamiento, y por lo tanto cada paciente con terapia dietética se encontraba en

una fase distinta del proceso de eliminación y reintroducción de los alimentos. Los resultados no son comparables con los obtenidos en estudios previos donde se realizan protocolos completos para definir dicha respuesta, realizando para ello varias EDAs y no una única EDA como en nuestro estudio ⁽⁹³⁾. Ocho pacientes (21,6%) estaban en tratamiento exclusivo con IBPs (esomeprazol y omeprazol), de los que 3 (37,5%) estaban en remisión. La literatura presenta tasas de remisión histológica con dicho tratamiento en torno al 50%, y por lo tanto algo superior a la nuestra. Sin embargo dichas publicaciones según un reciente meta-análisis presentan un sesgo importante, publicándose con una mayor frecuencia cuando los resultados son favorables ⁽¹⁸⁵⁾. Finalmente, 4 pacientes no recibían ningún tipo de tratamiento, 3 por ser la primera endoscopia diagnóstica de EEO y 1 en que la EDA se realizó de control tras reaparición de clínica digestiva (RGE) que resultó independiente de su EEO resuelta. Todos los pacientes sin tratamiento tenían la enfermedad activa, excepto el que había suspendido el tratamiento de su EEO hacía 5 años por haber normalizado la mucosa esofágica. Ese paciente había sido tratado con Budesonida oral viscous durante 3 meses en el pasado con lo que la mucosa esofágica se había normalizado sin presentar una recaída de la inflamación eosinofílica pese a la ausencia de tratamiento actual. Aunque la EEO se define como una enfermedad crónica, se han reportado casos como el de nuestro paciente en que tras finalizar un tratamiento que produce remisión clínica e histológica, la inflamación eosinofílica esofágica no reaparece ⁽¹⁸⁶⁾.

Para estudiar los cambios que se producen en la mucosa gastrointestinal más allá del esófago en la EEO, incluimos las descripciones anatómo-patológicas de

las biopsias duodenales de los pacientes con EEO y las comparamos con las de los pacientes con EC. La atrofia de las vellosidades ha sido considerada durante muchos años como el cambio principal para hacer el diagnóstico de EC⁽¹³⁷⁾. El reconocimiento posterior de alteraciones más leves, fue importante para entender las características histológicas de la enfermedad, especialmente el infiltrado inflamatorio del epitelio y de la LP^(138, 139). Marsh clasificó los patrones histológicos a partir del daño de la mucosa del intestino delgado, posteriormente modificado por Oberhuber. Es una clasificación corta y precisa de la lesión intestinal, que es útil tanto en el diagnóstico inicial como en el seguimiento de la EC. En nuestro estudio histológico de las biopsias de bulbo y 2ª porción de duodeno el número de pacientes en los que la AP no evidenciaba ninguna alteración (Marsh 0) fue significativamente mayor en los pacientes con EEO (86,5%) que en los pacientes con EC (25%) ($p<0,001$). Sin embargo se encontró linfocitosis duodenal (Marsh 1: $>25\%$ de LIEs) en el 13,5% de EEO vs el 37,5% de los pacientes con EC, sin que la diferencia fuese significativa ($p=0,137$). El estadio Marsh 1 no se considera diagnóstico de EC, precisamente porque la linfocitosis duodenal se ha descrito en otras patologías como la alergia no IgE mediada a alimentos^(140, 141) (proteínas de la leche, arroz, pollo, pescado, otros cereales), la presencia de infecciones como las debidas a *Helicobacter pylori*, la giardiasis y la criptosporidiosis^(17, 142). Sólo se informó de enteropatía con atrofia vellositaria (Marsh3) en 3 (37,5%) pacientes con EC. Ningún paciente con EEO la presentó ($p=0,004$). Estudiamos si la actividad de la enfermedad en la EEO se asociaba al estadiaje Marsh, pero no se encontraron diferencias significativas.

En esta tesis se describe por primera vez la existencia de linfocitosis duodenal en la EEO. La linfocitosis duodenal en el estudio histológico podría suponer el primer hallazgo de la alteración de la mucosa gastrointestinal fuera de la mucosa esofágica. Este hallazgo sin embargo podría formar parte de los mecanismos patogénicos de la alergia no IgE mediada involucrados en el desarrollo de la enfermedad sin tener vinculación con la inflamación eosinofílica esofágica. El estudio del LIE puede ayudar a esclarecer la asociación de la linfocitosis duodenal con la patogenia de la EEO.

EEO y linfograma intraepitelial duodenal (LIE)

El LIE duodenal en la enfermedad celiaca está ampliamente caracterizado. Los LIEs totales respecto de las células epiteliales están elevados por encima de un 12%. Los linfocitos T $\gamma\delta$ están elevados respecto del total de LIEs $\geq 10\%$ y también respecto de las células epiteliales $\geq 1\%$. Las NK intestinales respecto al total de LIEs están descendidas $< 20\%$. En los pacientes con EC que siguen dieta sin gluten los LIEs respecto de las células epiteliales se normalizan, quedando los LT $\gamma\delta$ elevados y las iNK bajas. Comprobamos que nuestra población de EC se comportaba según lo descrito en la literatura ^(14, 17) con diferencias significativas en el patrón LIE respecto a población no celiaca, excepto para los LIEs totales respecto de las CEI. Esto podría deberse en parte a la reducida muestra y a que 2 de los 8 pacientes EC se encontraban en tratamiento con dieta sin gluten, que como ya se ha descrito, normaliza este compartimento del LIE duodenal.

Los pacientes con EEO no mostraron diferencias en el LIE duodenal con la población de referencia. Dicha población en cualquier caso precisó EDA por síntomas esófago-gastrointestinales, por este motivo no podemos asumir que la población de referencia es una población sana ⁽¹⁴⁾. Según nuestro estudio, la actividad de la EEO a nivel local esofágico marcada por el nº de eosinófilos en esófago $\geq 15/\text{CGA}$, no se asociaba a alteración en el LIE duodenal de forma significativa; aunque no registramos ningún paciente con el porcentaje de LIEs respecto del total de CEI en duodeno alterado en pacientes EEO sin actividad, la diferencia con los EEO con actividad no fue significativa (0,0% vs 24,0%, $p=0,148$). Por este motivo, el resto de los análisis referidos al LIE se realizaron en el total de pacientes con EEO.

En el análisis comparativo del LIE de ambos grupos EC y EEO, encontramos que los pacientes con EC presentan un patrón claramente diferenciado de los EEO, con incremento de LIEs, LT $\gamma\delta$ y disminución de iNK, con significación estadística ($p<0,05$) excepto en el porcentaje de LIEs totales respecto de las CEI en duodeno en ambos grupos ($p=0,353$). Cuando los pacientes EC estaban en tratamiento (DSG), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la composición del linfograma intraepitelial duodenal con los pacientes con EEO tratados sin gluten. Dado que la dieta sin gluten normaliza la composición de los LIEs respecto del total de CEI en los celíacos, el análisis de ambos grupos en dieta con gluten debería diferenciar ambas poblaciones (EC vs EEO). Cuando la dieta contiene gluten encontramos diferencias estadísticamente significativas en todos los compartimentos del LIE salvo en los LIEs respecto al CEI en duodeno ($p=0,573$). Las diferencias encontradas en

los iNK respecto de los LIEs en EC frente a EEO no fueron significativas pero se acercaron la significación, alcanzándose probablemente con un número mayor de la muestra de EC. Relacionando ambos análisis (dieta con gluten y DSG en EC vs EEO) podemos concluir que la ingesta de gluten modifica el LIE duodenal de los pacientes celíacos, como está descrito en la literatura. Los pacientes con EEO en cuyo tratamiento se excluye el gluten de su dieta, presentan en nuestro estudio un LIE sin diferencias estadísticamente significativas con el de los celíacos tratados con dieta sin gluten. Sería necesario comprobar estos resultados aumentando el tamaño de la muestra en ambos grupos.

En el total de los pacientes con EEO, el 70% presentaba alteración en al menos un compartimento del LIE. El 19% (7/37) tenía alteración en dos de los compartimentos del LIE: en 4 se encontraban elevados en alguna porción de duodeno los LIEs respecto de CEI y disminuidas las iNK y en 3 estaban elevados los LT $\gamma\delta$ con disminución de las iNK. Sin embargo ninguno tenía los 3 compartimentos alterados (LIE respecto de CEI, LT $\gamma\delta$ e iNK). Quisimos comprobar si alguna de las variables estudiadas se asociaba con alguna de estas alteraciones del LIE duodenal. Encontramos que como Camarero C. et al ya describieron en población no EC (¹⁴), la edad se asocia al porcentaje de iNK intestinal en los pacientes con EEO, de modo que a mayor edad, mayor es el número de niños en los que este compartimento se encuentra disminuido ($\leq 20\%$). Comparamos 2 grupos (≤ 10 años y > 10 años) encontrando diferencias en el porcentaje de iNK respecto de los LIEs en duodeno ($\leq 20\%$) en el 11% vs el 50% respectivamente ($p=0,027$).

Encontramos también que la frecuencia de alteraciones en el LIE duodenal de pacientes EEO con HP era menor que en los pacientes EEO sin la infección, sin embargo estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). No podemos concluir que el HP tenga un papel protector sobre las alteraciones en el LIE duodenal de los pacientes con EEO.

Estudiamos si el estadiaje Marsh se asociaba a alteración en el LIE de los pacientes con EEO. No encontramos diferencias significativas, aunque los LIEs respecto del total de CEI en duodeno estaban alterados en un mayor porcentaje en los Marsh 1 50% vs los Marsh 0 (12,5%) ($p = 0,058$). De nuevo las diferencias aunque no alcancen significación estadística se localizan en el compartimento de LIEs respecto del total de CEI en el duodeno.

En el resto de los análisis que incluían pruebas complementarias y tratamientos recibidos no encontramos asociación con las alteraciones que hemos descrito en el LIE duodenal de los pacientes con EEO salvo en dos variables cuantitativas: el número de eosinófilos en sangre periférica y el número de eosinófilos/CGA en mucosa esofágica, que se asociaban a alteración en el porcentaje de LIEs respecto del total de CEI en duodeno. Sin embargo cuando estas variables se convertían en cualitativas con los puntos de cortes establecidos arbitrariamente (eosinofilia ≥ 450 eos/ μ L y actividad de EEO ≥ 15 eos/CGA en mucosa esofágica), no se encontraron diferencias significativas en ningún compartimento del LIE duodenal.

Los pacientes con el porcentaje de LIEs en duodeno patológico presentaban un mayor número de eosinófilos en sangre periférica que los que tenían un

porcentaje de LIEs normal ($p > 0,0001$). El punto de corte que mejor sensibilidad y especificidad ofrecía a partir de la curva ROC fue de 780 eos/ μ L. El porcentaje de LIEs del total de CEI alterado en duodeno también se asociaba con un mayor número de eosinófilos en mucosa esofágica ($p = 0,021$). El punto de corte que mejor sensibilidad y especificidad ofrecía a partir de la curva ROC fue de 45 eos/CGA. Este hallazgo vincula la alteración de la inmunidad de la mucosa intestinal con la inflamación a nivel esofágico.

Con estos resultados podemos anticipar que un paciente pediátrico con EEO tiene alterado el porcentaje de LIEs del CEI en duodeno cuando la cifra de eosinófilos en sangre periférica supera los 780/ μ L con una sensibilidad del 100% y una especificidad de casi el 90% y cuando la cifra de eosinófilos en mucosa esofágica supera los 45 eos/CGA con una sensibilidad del 67% y una especificidad del 83%.

Se sabe que la inmunidad adaptativa de las células T es fundamental para el desarrollo de EEO en modelos de ratón, como se ilustra en experimentos donde ratones deficientes en células B desarrollan EEO, mientras que los ratones deficientes en células B y T no la desarrollan ⁽¹⁶²⁾. Sin embargo se desconoce el papel de los LIEs duodenales. Los LIEs duodenales representan una población heterogénea de células T compuestas principalmente por células T CD8 citotóxicas que residen dentro de la capa epitelial, cuyo papel principal es mantener la integridad del epitelio eliminando células infectadas y promoviendo la reparación epitelial. La activación desregulada de los LIEs es un sello distintivo de la EC y está implicada críticamente en la destrucción de células epiteliales y el posterior desarrollo de atrofia vellosa. Sin embargo ninguno de

los pacientes con EEO desarrolló atrofia vellositaria (Marsh 3) pese a haberse identificado un aumento de los LIEs en duodeno. Sería esperable que el subtipo de LIEs que se encuentra aumentado en algunos pacientes con EEO perteneciese al linaje de los LT $\alpha\beta$, puesto que tanto los LT $\gamma\delta$ como los CD3- no parecen alterarse significativamente. Aunque la mayoría de los LT $\alpha\beta$ son CD8+, podría ser que en nuestros pacientes los CD4+ fueran los responsables de dicha alteración a nivel del epitelio intestinal.

Nuestros hallazgos abren una prometedora vía de investigación donde poder explorar los subtipos de LIEs duodenales y los posibles mecanismos patogénicos, mediante marcadores reguladores y expresión de citoquinas de pacientes con EEO.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con esofagitis eosinofílica (EEO) estudiados en esta tesis constituyen un grupo fenotípico complejo dentro de la EEO, puesto de manifiesto por las mayores tasas de atopia y en concreto de alergia IgE mediada a alimentos que las referidas en la literatura.
2. En nuestra serie, los pacientes con DA presentan con mayor frecuencia EEO activa. El antecedente de DA podría actuar como un factor de mal pronóstico para el control de la enfermedad y podría determinar la elección de terapias más intensas desde el inicio del tratamiento.
3. En esta tesis hemos realizado por primera vez una descripción de la existencia de linfocitosis duodenal en la EEO. La linfocitosis duodenal en el estudio histológico podría suponer el primer hallazgo de la alteración de la mucosa gastrointestinal fuera de la mucosa esofágica.
4. El LIE duodenal estudiado por citometría de flujo:
 - a. Se encuentra alterado en un alto porcentaje de pacientes con EEO.
 - b. Es similar en pacientes con EEO comparado al de pacientes con enfermedad celiaca (población de referencia) cuando ambos grupos excluyen el gluten de su dieta.

- c. Es diferente en ambos grupos (EEo vs EC) salvo respecto al total de células epiteliales en duodeno, cuando la dieta contiene gluten.
- 5. Hemos descrito por primera vez que el número de eosinófilos en sangre periférica y el número de eosinófilos en mucosa esofágica se asocian al porcentaje de linfocitos intraepiteliales respecto del total de células epiteliales en duodeno.
- 6. Nuestros resultados apoyan que la esofagitis eosinofílica es una enfermedad inmunomediada donde el sistema inmune de la mucosa intestinal y la inmunidad sistémica están implicados en la patogenia de la enfermedad.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Montalvillo Álvarez E. Linfocitos Intraepiteliales y Células Dendríticas: Distribución y utilidad en el diagnóstico y en la modulación de la respuesta inmunitaria intestinal [tesis doctoral en Internet]. Valladolid: Universidad de Valladolid; 2014 [citada 26 abril 2017]. Disponible en: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/7917>
2. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):331-41.
3. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005;307(5717):1920-5.
4. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):411-20.
5. Diebold RJ, Eis MJ, Yin M, Ormsby I, Boivin GP, Darrow BJ, et al. Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(26):12215-9.
6. Ebert EC, Roberts AI. Lymphokine-activated killing by human intestinal lymphocytes. *Cell Immunol*. 1993;146(1):107-16.
7. Shires J, Theodoridis E, Hayday AC. Biological insights into TCRgammadelta+ and TCRalphabeta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). *Immunity*. 2001;15(3):419-34.
8. Cheroutre H, Madakamutil L. Mucosal effector memory T cells: the other side of the coin. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(23):2853-66.

9. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(7):445-56.
10. Fujihashi K, Dohi T, Kweon MN, McGhee JR, Koga T, Cooper MD, et al. gammadelta T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion. *Int Immunol*. 1999;11(12):1907-16.
11. Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, Matsumoto S, Hashimoto Y, Obana S, et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(13):6147-51.
12. Denning TL, Granger SW, Mucida D, Graddy R, Leclercq G, Zhang W, et al. Mouse TCRalpha+CD8alpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J Immunol*. 2007;178(7):4230-9.
13. Carpenter AC, Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol*. 2010;11(8):666-73.
14. Camarero C, Leon F, Sanchez L, Asensio A, Roy G. Age-related variation of intraepithelial lymphocytes subsets in normal human duodenal mucosa. *Dig Dis Sci*. 2007;52(3):685-91.
15. Leon F, Roldan E, Sanchez L, Camarero C, Bootello A, Roy G. Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology*. 2003;125(2):345-56.
16. Bhagat G, Naiyer AJ, Shah JG, Harper J, Jabri B, Wang TC, et al. Small intestinal CD8+TCRgamma+delta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest*. 2008;118(1):281-93.

17. Camarero C, Eiras P, Asensio A, Leon F, Olivares F, Escobar H, et al. Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor gammadelta subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr.* 2000;89(3):285-90.
18. Eiras P, Leon F, Camarero C, Lombardia M, Roldan E, Bootello A, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes contain a CD3- CD7+ subset expressing natural killer markers and a singular pattern of adhesion molecules. *Scand J Immunol.* 2000;52(1):1-6.
19. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol.* 4. England 2004. p. 231-7.
20. Wingender G, Kronenberg M. Role of NKT cells in the digestive system. IV. The role of canonical natural killer T cells in mucosal immunity and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294(1):G1-8.
21. Chehade M, Sampson HA. The role of lymphocytes in eosinophilic gastrointestinal disorders. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2009;29(1):149-58, xii.
22. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2001;2(4):361-7.
23. Sicinski P, Rowinski J, Warchol JB, Jarzabek Z, Gut W, Szczygiel B, et al. Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology.* 1990;98(1):56-8.
24. Shreedhar VK, Kelsall BL, Neutra MR. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. *Infect Immun.* 2003;71(1):504-9.

25. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Transepithelial transport and mucosal defence II: secretion of IgA. *Trends Cell Biol.* 1992;2(6):170-4.
26. Sanderson IR, Walker WA. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology.* 1993;104(2):622-39.
27. Scott H, Solheim BG, Brandtzaeg P, Thorsby E. HLA-DR-like antigens in the epithelium of the human small intestine. *Scand J Immunol.* 1980;12(1):77-82.
28. Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz CG, Bitar DM. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol.* 1991;147(7):2155-63.
29. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev.* 2003;192:161-80.
30. Mayer L, Shlien R. Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med.* 1987;166(5):1471-83.
31. Trop S, Samsonov D, Gotsman I, Alper R, Diment J, Ilan Y. Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model. *Hepatology.* 1999;29(3):746-55.
32. Barone KS, Jain SL, Michael JG. Effect of in vivo depletion of CD4+ and CD8+ cells on the induction and maintenance of oral tolerance. *Cell Immunol.* 1995;163(1):19-29.
33. Meade R, Askenase PW, Geba GP, Neddermann K, Jacoby RO, Pasternak RD. Transforming growth factor-beta 1 inhibits murine immediate and delayed type hypersensitivity. *J Immunol.* 1992;149(2):521-8.

34. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737-42.
35. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 2001;194(5):629-44.
36. Rostoker G, Delchier JC, Chaumette MT. Increased intestinal intra-epithelial T lymphocytes in primary glomerulonephritis: a role of oral tolerance breakdown in the pathophysiology of human primary glomerulonephritides? *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(3):513-7.
37. Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, Atkins D, Attwood SE, Bonis PA, et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(1):3-20.e6; quiz 1-2.
38. Hruz P. Epidemiology of eosinophilic esophagitis. *Dig Dis*. 2014;32(1-2):40-7.
39. Soon IS, Butzner JD, Kaplan GG, deBruyn JC. Incidence and prevalence of eosinophilic esophagitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;57(1):72-80.
40. Papadopoulou A, Koletzko S, Heuschkel R, Dias JA, Allen KJ, Murch SH, et al. Management guidelines of eosinophilic esophagitis in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;58(1):107-18.
41. van Rhijn BD, Verheij J, Smout AJ, Bredenoord AJ. Rapidly increasing incidence of eosinophilic esophagitis in a large cohort. *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25(1):47-52.e5.

42. Lucendo AJ, Molina-Infante J, Arias A, von Arnim U, Bredenoord AJ, Bussmann C, et al. Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. *United European Gastroenterol J*. 2017;5(3):335-58.
43. Arias A, Perez-Martinez I, Tenias JM, Lucendo AJ. Systematic review with meta-analysis: the incidence and prevalence of eosinophilic oesophagitis in children and adults in population-based studies. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(1):3-15.
44. Spergel JM. New genetic links in eosinophilic esophagitis. *Genome Med*. 2010;2(12):237. England 2010. p. 60.
45. Guarino MP, Cicala M, Behar J. Eosinophilic esophagitis: New insights in pathogenesis and therapy. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2016;7(1):66-77.
46. Alexander ES, Martin LJ, Collins MH, Kottyan LC, Sucharew H, He H, et al. Twin and family studies reveal strong environmental and weaker genetic cues explaining heritability of eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(5):1084-92.e1.
47. Abonia JP, Wen T, Stucke EM, Grotjan T, Griffith MS, Kemme KA, et al. High prevalence of eosinophilic esophagitis in patients with inherited connective tissue disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(2):378-86.
48. Blanchard C, Wang N, Stringer KF, Mishra A, Fulkerson PC, Abonia JP, et al. Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene-expression profile in eosinophilic esophagitis. *J Clin Invest*. 2006;116(2):536-47.

49. Blanchard C, Stucke EM, Burwinkel K, Caldwell JM, Collins MH, Ahrens A, et al. Coordinate interaction between IL-13 and epithelial differentiation cluster genes in eosinophilic esophagitis. *J Immunol*. 2010;184(7):4033-41.
50. Blanchard C. Molecular pathogenesis of eosinophilic esophagitis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015;31(4):321-7.
51. Chandramouleeswaran PM, Shen D, Lee AJ, Benitez A, Dods K, Gambanga F, et al. Preferential Secretion of Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) by Terminally Differentiated Esophageal Epithelial Cells: Relevance to Eosinophilic Esophagitis (EoE). *PLoS One*. 2016;11(3):e0150968.
52. Singla MB, Moawad FJ. An Overview of the Diagnosis and Management of Eosinophilic Esophagitis. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016;7:e155.
53. Gupta SK, Fitzgerald JF, Kondratyuk T, HogenEsch H. Cytokine expression in normal and inflamed esophageal mucosa: a study into the pathogenesis of allergic eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006;42(1):22-6.
54. Blanchard C, Mingler MK, Vicario M, Abonia JP, Wu YY, Lu TX, et al. IL-13 involvement in eosinophilic esophagitis: transcriptome analysis and reversibility with glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(6):1292-300.
55. Davis BP, Stucke EM, Khorki ME, Litosh VA, Rymer JK, Rochman M, et al. Eosinophilic esophagitis-linked calpain 14 is an IL-13-induced protease that mediates esophageal epithelial barrier impairment. *JCI Insight*. 2016;1(4):e86355.
56. Sherrill JD, Kiran KC, Blanchard C, Stucke EM, Kemme KA, Collins MH, et al. Analysis and expansion of the eosinophilic esophagitis transcriptome by RNA sequencing. *Genes Immun*. 2014;15(6):361-9.

57. Rochman M, Kartashov AV, Caldwell JM, Collins MH, Stucke EM, Kc K, et al. Neurotrophic tyrosine kinase receptor 1 is a direct transcriptional and epigenetic target of IL-13 involved in allergic inflammation. *Mucosal Immunol.* 2015;8(4):785-98.
58. Abonia JP, Blanchard C, Butz BB, Rainey HF, Collins MH, Stringer K, et al. Involvement of mast cells in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(1):140-9.
59. Jyonouchi S, Smith CL, Saretta F, Abraham V, Ruymann KR, Modayur-Chandramouleeswaran P, et al. Invariant natural killer T cells in children with eosinophilic esophagitis. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(1):58-68.
60. Zhang S, Wu X, Yu S. Prostaglandin D2 receptor D-type prostanoid receptor 2 mediates eosinophil trafficking into the esophagus. *Dis Esophagus.* 2014;27(6):601-6.
61. Niranjan R, Mavi P, Rayapudi M, Dynda S, Mishra A. Pathogenic role of mast cells in experimental eosinophilic esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;304(12):G1087-94.
62. Rayapudi M, Rajavelu P, Zhu X, Kaul A, Niranjan R, Dynda S, et al. Invariant natural killer T-cell neutralization is a possible novel therapy for human eosinophilic esophagitis. *Clin Transl Immunology.* 2014;3(1):e9.
63. Guajardo JR, Plotnick LM, Fende JM, Collins MH, Putnam PE, Rothenberg ME. Eosinophil-associated gastrointestinal disorders: a world-wide-web based registry. *J Pediatr.* 2002;141(4):576-81.
64. Jyonouchi S, Brown-Whitehorn TA, Spergel JM. Association of eosinophilic gastrointestinal disorders with other atopic disorders. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2009;29(1):85-97, x.

65. Roy-Ghanta S, Larosa DF, Katzka DA. Atopic characteristics of adult patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(5):531-5.
66. Noel RJ, Putnam PE, Rothenberg ME. Eosinophilic esophagitis. *N Engl J Med.* 351. United States 2004. p. 940-1.
67. Ridolo E, De Angelis GL, Dall'aglio P. Eosinophilic esophagitis after specific oral tolerance induction for egg protein. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 106. United States 2011. p. 73-4.
68. Lucendo AJ, Arias A, Tenias JM. Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: a systematic review with meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014;113(6):624-9.
69. Sanchez-Garcia S, Rodriguez Del Rio P, Escudero C, Martinez-Gomez MJ, Ibanez MD. Possible eosinophilic esophagitis induced by milk oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 129. United States 2012. p. 1155-7.
70. Clayton F, Fang JC, Gleich GJ, Lucendo AJ, Olalla JM, Vinson LA, et al. Eosinophilic esophagitis in adults is associated with IgG4 and not mediated by IgE. *Gastroenterology.* 2014;147(3):602-9.
71. Spergel JM, Brown-Whitehorn TF, Beausoleil JL, Franciosi J, Shuker M, Verma R, et al. 14 years of eosinophilic esophagitis: clinical features and prognosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48(1):30-6.
72. Yamazaki K, Murray JA, Arora AS, Alexander JA, Smyrk TC, Butterfield JH, et al. Allergen-specific in vitro cytokine production in adult patients with eosinophilic esophagitis. *Dig Dis Sci.* 2006;51(11):1934-41.

73. Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Rothenberg ME. An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis. *J Clin Invest.* 2001;107(1):83-90.
74. Green DJ, Cotton CC, Dellon ES. The Role of Environmental Exposures in the Etiology of Eosinophilic Esophagitis: A Systematic Review. *Mayo Clin Proc.* 2015;90(10):1400-10.
75. van Rhijn BD, van Ree R, Versteeg SA, Vlieg-Boerstra BJ, Sprickelman AB, Terreehorst I, et al. Birch pollen sensitization with cross-reactivity to food allergens predominates in adults with eosinophilic esophagitis. *Allergy.* 2013;68(11):1475-81.
76. Babaie D, Mesdaghi M, Nishino M, Mansouri M, Ebisawa M. Oral and Sublingual Immunotherapy: Potential Causes for Eosinophilic Gastrointestinal Disorders? *Int Arch Allergy Immunol.* 2017;172(2):89-98.
77. Kedika RR, Souza RF, Spechler SJ. Potential anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors: a review and discussion of the clinical implications. *Dig Dis Sci.* 2009;54(11):2312-7.
78. Park JY, Zhang X, Nguyen N, Souza RF, Spechler SJ, Cheng E. Proton pump inhibitors decrease eotaxin-3 expression in the proximal esophagus of children with esophageal eosinophilia. *PLoS One.* 2014;9(7):e101391.
79. Molina-Infante J, Gonzalez-Cordero PL, Lucendo AJ. Proton pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia: still a valid diagnosis? *Curr Opin Gastroenterol.* 2017.
80. Dellon ES, Gonsalves N, Hirano I, Furuta GT, Liacouras CA, Katzka DA. ACG clinical guideline: Evidenced based approach to the diagnosis and

management of esophageal eosinophilia and eosinophilic esophagitis (EoE). *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):679-92; quiz 93.

81. Sant'Anna AM, Rolland S, Fournet JC, Yazbeck S, Drouin E. Eosinophilic esophagitis in children: symptoms, histology and pH probe results. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39(4):373-7.

82. Kim HP, Vance RB, Shaheen NJ, Dellon ES. The prevalence and diagnostic utility of endoscopic features of eosinophilic esophagitis: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(9):988-96.e5.

83. Peery AF, Cao H, Dominik R, Shaheen NJ, Dellon ES. Variable reliability of endoscopic findings with white-light and narrow-band imaging for patients with suspected eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(6):475-80.

84. Hirano I, Moy N, Heckman MG, Thomas CS, Gonsalves N, Achem SR. Endoscopic assessment of the oesophageal features of eosinophilic oesophagitis: validation of a novel classification and grading system. *Gut*. 2013;62(4):489-95.

85. Collins MH, Martin LJ, Alexander ES, Boyd JT, Sheridan R, He H, et al. Newly developed and validated eosinophilic esophagitis histology scoring system and evidence that it outperforms peak eosinophil count for disease diagnosis and monitoring. *Dis Esophagus*. 2017;30(3):1-8.

86. Gutierrez-Junquera C, Fernandez-Fernandez S, Cilleruelo ML, Rayo A, Echeverria L, Quevedo S, et al. High Prevalence of Response to Proton-pump Inhibitor Treatment in Children With Esophageal Eosinophilia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(5):704-10.

87. Henderson CJ, Abonia JP, King EC, Putnam PE, Collins MH, Franciosi JP, et al. Comparative dietary therapy effectiveness in remission of pediatric eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(6):1570-8.
88. Molina-Infante J, Arias A, Barrio J, Rodriguez-Sanchez J, Sanchez-Cazalilla M, Lucendo AJ. Four-food group elimination diet for adult eosinophilic esophagitis: A prospective multicenter study. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(5):1093-9.e1.
89. Molina-Infante J, Gonzalez-Cordero PL, Arias A, Lucendo AJ. Update on dietary therapy for eosinophilic esophagitis in children and adults. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(2):115-23.
90. Groetch M, Venter C, Skypala I, Vlieg-Boerstra B, Grimshaw K, Durban R, et al. Dietary Therapy and Nutrition Management of Eosinophilic Esophagitis: A Work Group Report of the American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(2):312-24.e29.
91. Safroneeva E, Coslovsky M, Kuehni CE, Zwahlen M, Haas NA, Panczak R, et al. Eosinophilic oesophagitis: relationship of quality of life with clinical, endoscopic and histological activity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;42(8):1000-10.
92. Asher Wolf W, Huang KZ, Durban R, Iqbal ZJ, Robey BS, Khalid FJ, et al. The Six-Food Elimination Diet for Eosinophilic Esophagitis Increases Grocery Shopping Cost and Complexity. *Dysphagia*. 2016;31(6):765-70.
93. Arias A, Gonzalez-Cervera J, Tenias JM, Lucendo AJ. Efficacy of dietary interventions for inducing histologic remission in patients with eosinophilic esophagitis: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2014;146(7):1639-48.

94. Liacouras CA, Wenner WJ, Brown K, Ruchelli E. Primary eosinophilic esophagitis in children: successful treatment with oral corticosteroids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998;26(4):380-5.
95. Aceves SS, Bastian JF, Newbury RO, Dohil R. Oral viscous budesonide: a potential new therapy for eosinophilic esophagitis in children. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(10):2271-9; quiz 80.
96. Dohil R, Newbury R, Fox L, Bastian J, Aceves S. Oral viscous budesonide is effective in children with eosinophilic esophagitis in a randomized, placebo-controlled trial. *Gastroenterology.* 2010;139(2):418-29.
97. Dellon ES, Sheikh A, Speck O, Woodward K, Whitlow AB, Hores JM, et al. Viscous topical is more effective than nebulized steroid therapy for patients with eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology.* 2012;143(2):321-4.e1.
98. Gupta SK, Vitanza JM, Collins MH. Efficacy and safety of oral budesonide suspension in pediatric patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(1):66-76.e3.
99. Straumann A, Conus S, Degen L, Frei C, Bussmann C, Beglinger C, et al. Long-term budesonide maintenance treatment is partially effective for patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(5):400-9.e1.
100. Konikoff MR, Noel RJ, Blanchard C, Kirby C, Jameson SC, Buckmeier BK, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fluticasone propionate for pediatric eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology.* 2006;131(5):1381-91.
101. Schaefer ET, Fitzgerald JF, Molleston JP, Croffie JM, Pfefferkorn MD, Corkins MR, et al. Comparison of oral prednisone and topical fluticasone in the

treatment of eosinophilic esophagitis: a randomized trial in children. Clin Gastroenterol Hepatol. 2008;6(2):165-73.

102. Albert D, Heifert TA, Min SB, Maydonovitch CL, Baker TP, Chen YJ, et al. Comparisons of Fluticasone to Budesonide in the Treatment of Eosinophilic Esophagitis. Dig Dis Sci. 2016;61(7):1996-2001.

103. Fable JM, Fernandez M, Goodine S, Lerer T, Sayej WN. Retrospective Comparison of Fluticasone Propionate and Oral Viscous Budesonide in Children with Eosinophilic Esophagitis. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2017.

104. Murali AR, Gupta A, Attar BM, Ravi V, Koduru P. Topical steroids in eosinophilic esophagitis: Systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomized clinical trials. J Gastroenterol Hepatol. 2016;31(6):1111-9.

105. Golekoh MC, Hornung LN, Mukkada VA, Khoury JC, Putnam PE, Backeljauw PF. Adrenal Insufficiency after Chronic Swallowed Glucocorticoid Therapy for Eosinophilic Esophagitis. J Pediatr. 2016;170:240-5.

106. Ahmet A, Benchimol EI, Goldbloom EB, Barkey JL. Adrenal suppression in children treated with swallowed fluticasone and oral viscous budesonide for eosinophilic esophagitis. Allergy Asthma Clin Immunol. 2016;12:49.

107. Assa'ad AH, Gupta SK, Collins MH, Thomson M, Heath AT, Smith DA, et al. An antibody against IL-5 reduces numbers of esophageal intraepithelial eosinophils in children with eosinophilic esophagitis. Gastroenterology. 2011;141(5):1593-604.

108. Straumann A, Conus S, Grzonka P, Kita H, Kephart G, Bussmann C, et al. Anti-interleukin-5 antibody treatment (mepolizumab) in active eosinophilic

oesophagitis: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Gut*. 2010;59(1):21-30.

109. Garrett JK, Jameson SC, Thomson B, Collins MH, Wagoner LE, Freese DK, et al. Anti-interleukin-5 (mepolizumab) therapy for hypereosinophilic syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(1):115-9.

110. Maki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet*. 1997;349(9067):1755-9.

111. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(9):647-55.

112. Choung RS, Larson SA, Khaleghi S, Rubio-Tapia A, Ovsyannikova IG, King KS, et al. Prevalence and Morbidity of Undiagnosed Celiac Disease From a Community-Based Study. *Gastroenterology*. 2017;152(4):830-9.e5.

113. Castano L, Blarduni E, Ortiz L, Nunez J, Bilbao JR, Rica I, et al. Prospective population screening for celiac disease: high prevalence in the first 3 years of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39(1):80-4.

114. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet*. 1994;343(8891):200-3.

115. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:493-525.

116. Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, Fleckenstein B, Lundin KE, Jorgensen TJ, et al. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*. 2002;123(3):803-9.

117. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 2003;362(9377):30-7.
118. Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W, Kooy YM, et al. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med*. 2000;191(4):603-12.
119. Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 2004;21(3):367-77.
120. Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, et al. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*. 2006;203(5):1343-55.
121. Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3(9):516-25.
122. Meresse B, Ripoché J, Heyman M, Cerf-Bensussan N. Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol*. 2009;2(1):8-23.
123. Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest*. 2007;117(1):41-9.
124. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*. 2009;137(6):1912-33.
125. Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C, Cerf-Bensussan N, et al. Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. 2003;125(3):696-707.

126. Garrote JA, Gomez-Gonzalez E, Bernardo D, Arranz E, Chirido F. Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47 Suppl 1:S27-32.
127. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology.* 1993;105(3):910-22.
128. Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R, Maiella G, et al. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol.* 2009;70(1):55-9.
129. Greco L, Corazza G, Babron MC, Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Percopo S, et al. Genome search in celiac disease. *Am J Hum Genet.* 1998;62(3):669-75.
130. Holopainen P, Naluai AT, Moodie S, Percopo S, Coto I, Clot F, et al. Candidate gene region 2q33 in European families with coeliac disease. *Tissue Antigens.* 2004;63(3):212-22.
131. Van Belzen MJ, Meijer JW, Sandkuijl LA, Bardoel AF, Mulder CJ, Pearson PL, et al. A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology.* 2003;125(4):1032-41.
132. Amundsen SS, Monsuur AJ, Wapenaar MC, Lie BA, Ek J, Gudjonsdottir AH, et al. Association analysis of MYO9B gene polymorphisms with celiac disease in a Swedish/Norwegian cohort. *Hum Immunol.* 2006;67(4-5):341-5.
133. Briani C, Samaroo D, Alaedini A. Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2008;7(8):644-50.
134. Catassi C, Fasano A. Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms. *Am J Med.* 2010;123(8):691-3.
135. Ribes-Koninckx C, Mearin ML, Korponay-Szabo IR, Shamir R, Husby S, Ventura A, et al. Coeliac disease diagnosis: ESPGHAN 1990 criteria or need for

a change? Results of a questionnaire. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(1):15-9.

136. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(1):136-60.

137. Murray JA, Green PH. Biopsy is the gold standard of diagnosis of celiac sprue. *Gastroenterology.* 116. United States 1999. p. 1273-4.

138. Marsh MN. The immunopathology of the small intestinal reaction in gluten-sensitivity. *Immunol Invest.* 1989;18(1-4):509-31.

139. Marsh MN, Bjarnason I, Shaw J, Ellis A, Baker R, Peters TJ. Studies of intestinal lymphoid tissue. XIV--HLA status, mucosal morphology, permeability and epithelial lymphocyte populations in first degree relatives of patients with coeliac disease. *Gut.* 1990;31(1):32-6.

140. Mavromichalis J, Brueton MJ, McNeish AS, Anderson CM. Evaluation of the intraepithelial lymphocyte count in the jejunum in childhood enteropathies. *Gut.* 1976;17(8):600-3.

141. Kokkonen J, Holm K, Karttunen TJ, Maki M. Children with untreated food allergy express a relative increment in the density of duodenal gammadelta+ T cells. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35(11):1137-42.

142. Basyigit S, Unsal O, Uzman M, Sapmaz F, Dogan OC, Kefeli A, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and celiac disease: a cross-sectional study and a brief review of the literature. *Prz Gastroenterol.* 2017;12(1):49-54.

143. Eiras P, Roldan E, Camarero C, Olivares F, Bootello A, Roy G. Flow cytometry description of a novel CD3-/CD7+ intraepithelial lymphocyte subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease. *Cytometry*. 1998;34(2):95-102.
144. Eiras P, Leon F, Camarero C, Roy G. [Intraepithelial lymphocytes in the diagnosis of latent-potential celiac disease]. *Rev Clin Esp*. 2002;202(9):497-9.
145. Leon F, Eiras P, Roy G, Camarero C. Intestinal intraepithelial lymphocytes and anti-transglutaminase in a screening algorithm for coeliac disease. *Gut*. 2002;50(5):740-1.
146. Leon F, Roy G. Isolation of human small bowel intraepithelial lymphocytes by annexin V-coated magnetic beads. *Lab Invest*. 2004;84(6):804-9.
147. Leon F, Roy G. On the complexity of human CD3- intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. 126. United States 2004. p. 1217-8; author reply 8-9.
148. Leon F, Camarero C, Eiras P, Roy G. Specificity of IEL profiling in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 99. United States 2004. p. 958.
149. Leon F, Sanchez L, Camarero C, Roy G. Cytokine production by intestinal intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2005;50(3):593-600.
150. De Andres A, Camarero C, Roy G. Distal duodenum versus duodenal bulb: intraepithelial lymphocytes have something to say in celiac disease diagnosis. *Dig Dis Sci*. 2015;60(4):1004-9.
151. Roy Ariño G. Inmunofenotipaje por citometría de flujo: el linfograma intraepitelial. En: Arranz E, Garrote JA, editores. *Enfermedad Celíaca*.

Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca. Madrid: Ergon; 2011. p.119-128.

152. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*. 1992;102(1):330-54.

153. Halstensen TS, Brandtzaeg P. Activated T lymphocytes in the celiac lesion: non-proliferative activation (CD25) of CD4+ alpha/beta cells in the lamina propria but proliferation (Ki-67) of alpha/beta and gamma/delta cells in the epithelium. *Eur J Immunol*. 1993;23(2):505-10.

154. Spencer J, MacDonald TT, Diss TC, Walker-Smith JA, Ciclitira PJ, Isaacson PG. Changes in intraepithelial lymphocyte subpopulations in coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine). *Gut*. 1989;30(3):339-46.

155. Augustin MT, Kokkonen J, Karttunen TJ. Duodenal cytotoxic lymphocytes in cow's milk protein sensitive enteropathy and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(12):1398-406.

156. Spencer J, Isaacson PG, MacDonald TT, Thomas AJ, Walker-Smith JA. Gamma/delta T cells and the diagnosis of coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 1991;85(1):109-13.

157. Nilssen DE, Halstensen TS, Froland SS, Fausa O, Brandtzaeg P. Distribution and phenotypes of duodenal intraepithelial gamma/delta T cells in patients with various types of primary B-cell deficiency. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993;68(3):301-10.

158. Iltanen S, Rantala I, Laippala P, Holm K, Partanen J, Maki M. Expression of HSP-65 in jejunal epithelial cells in patients clinically suspected of coeliac disease. *Autoimmunity*. 1999;31(2):125-32.
159. Nilssen DE, Aukrust P, Froland SS, Muller F, Fausa O, Halstensen TS, et al. Duodenal intraepithelial gamma/delta T cells and soluble CD8, neopterin, and beta 2-microglobulin in serum of IgA-deficient subjects with or without IgG subclass deficiency. *Clin Exp Immunol*. 1993;94(1):91-8.
160. Savilahti E, Arato A, Verkasalo M. Intestinal gamma/delta receptor-bearing T lymphocytes in celiac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant increase in celiac disease. *Pediatr Res*. 1990;28(6):579-81.
161. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6):1105-18.
162. Mishra A, Schlotman J, Wang M, Rothenberg ME. Critical role for adaptive T cell immunity in experimental eosinophilic esophagitis in mice. *J Leukoc Biol*. 2007;81(4):916-24.
163. Dharmaraj R, Hagglund K, Lyons H. Eosinophilic esophagitis associated with celiac disease in children. *BMC Res Notes*. 2015;8:263.
164. Hommeida S, Alsawas M, Murad MH, Katzka DA, Grothe RM, Absah I. The Association Between Celiac Disease and Eosinophilic Esophagitis: Mayo Experience and Meta-analysis of the Literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016.

165. Verzeegnassi F, Bua J, De Angelis P, Dall'oglio L, Di Leo G, Ventura A. Eosinophilic oesophagitis and coeliac disease: is it just a casual association? *Gut*. 56. England 2007. p. 1029-30.
166. Ari A, Morgenstern S, Chodick G, Matar M, Silbermintz A, Assa A, et al. Oesophageal eosinophilia in children with coeliac disease. *Arch Dis Child*. 2017.
167. Lucendo AJ, Arias A, Tenias JM. Systematic review: the association between eosinophilic oesophagitis and coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(5):422-34.
168. Villarrubia N, Leon F, Bootello A. [T gamma-delta lymphocytes and their role in hypersensitivity processes in the digestive and respiratory mucosa]. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2002;30(5):273-82.
169. Gonzalez-Cervera J, Arias A, Redondo-Gonzalez O, Cano-Mollinedo MM, Terreehorst I, Lucendo AJ. Association between atopic manifestations and eosinophilic esophagitis: A systematic review and meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;118(5):582-90.e2.
170. Prasad GA, Alexander JA, Schleck CD, Zinsmeister AR, Smyrk TC, Elias RM, et al. Epidemiology of eosinophilic esophagitis over three decades in Olmsted County, Minnesota. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(10):1055-61.
171. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, Bacharier LB, Boehmer SJ, Krawiec M, et al. Atopic characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(6):1282-7.

172. Venturelli N, Lexmond WS, Ohsaki A, Nurko S, Karasuyama H, Fiebiger E, et al. Allergic skin sensitization promotes eosinophilic esophagitis through the IL-33-basophil axis in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(5):1367-80.e5.
173. Elias MS, Long HA, Newman CF, Wilson PA, West A, McGill PJ, et al. Proteomic analysis of filaggrin deficiency identifies molecular signatures characteristic of atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol*. 2017.
174. Totsuka A, Omori-Miyake M, Kawashima M, Yagi J, Tsunemi Y. Expression of keratin 1, keratin 10, desmoglein 1 and desmocollin 1 in the epidermis: possible downregulation by interleukin-4 and interleukin-13 in atopic dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2017.
175. Straumann A, Aceves SS, Blanchard C, Collins MH, Furuta GT, Hirano I, et al. Pediatric and adult eosinophilic esophagitis: similarities and differences. *Allergy*. 2012;67(4):477-90.
176. Assa'ad AH, Putnam PE, Collins MH, Akers RM, Jameson SC, Kirby CL, et al. Pediatric patients with eosinophilic esophagitis: an 8-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(3):731-8.
177. Spergel JM, Brown-Whitehorn TF, Cianferoni A, Shuker M, Wang ML, Verma R, et al. Identification of causative foods in children with eosinophilic esophagitis treated with an elimination diet. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(2):461-7.e5.
178. Spergel JM, Andrews T, Brown-Whitehorn TF, Beausoleil JL, Liacouras CA. Treatment of eosinophilic esophagitis with specific food elimination diet directed by a combination of skin prick and patch tests. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;95(4):336-43.

179. Simon D, Cianferoni A, Spergel JM, Aceves S, Holbreich M, Venter C, et al. Eosinophilic esophagitis is characterized by a non-IgE-mediated food hypersensitivity. *Allergy*. 2016;71(5):611-20.
180. Dellon ES, Peery AF, Shaheen NJ, Morgan DR, Hurrell JM, Lash RH, et al. Inverse association of esophageal eosinophilia with *Helicobacter pylori* based on analysis of a US pathology database. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1586-92.
181. Elitsur Y, Alrazzak BA, Preston D, Demetieva Y. Does *Helicobacter pylori* protect against eosinophilic esophagitis in children? *Helicobacter*. 2014;19(5):367-71.
182. Sonnenberg A, Dellon ES, Turner KO, Genta RM. The influence of *Helicobacter pylori* on the ethnic distribution of esophageal eosinophilia. *Helicobacter*. 2017;22(3).
183. von Arnim U, Wex T, Link A, Messerschmidt M, Venerito M, Miehlike S, et al. *Helicobacter pylori* infection is associated with a reduced risk of developing eosinophilic oesophagitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(7):825-30.
184. Kalach N, Huvenne H, Gosset P, Papadopoulos S, Dehecq E, Decoster A, et al. Eosinophil counts in upper digestive mucosa of Western European children: variations with age, organs, symptoms, *Helicobacter pylori* status, and pathological findings. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;52(2):175-82.
185. Lucendo AJ, Arias A, Molina-Infante J. Efficacy of Proton Pump Inhibitor Drugs for Inducing Clinical and Histologic Remission in Patients With Symptomatic Esophageal Eosinophilia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14(1):13-22.e1.

186. Atkins D, Furuta GT, Liacouras CA, Spergel JM. Eosinophilic esophagitis phenotypes: Ready for prime time? *Pediatr Allergy Immunol.* 2017;28(4):312-9.